

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

DOTTORATO DI RICERCA IN
GENETICA E MEDICINA MOLECOLARE
XVIII CICLO



BIOGENESI DEI GRANULI SECRETORI
IN CELLULE EPITELIALI POLARIZZATE

Coordinatore:

Ch.mo Prof.

Carmelo Bruno Bruni

Candidato:

Dott.ssa Flaviana Gentile

DOCENTE GUIDA:

Ch.mo Prof. Lucio Nitsch

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

INDICE

INTRODUZIONE.....	pag. 3
Secrezione costitutiva e secrezione	
regolata.....	pag. 4
Granuli secretori.....	pag. 4
Modelli di sorting.....	pag. 5
Le granine.....	pag. 7
Segnali di sorting.....	pag. 8
VGF.....	pag. 9
Scopo del lavoro.....	pag. 9
MATERIALI E METODI.....	pag. 11
Colture cellulari e trasfezioni.....	pag. 12
Plasmidi.....	pag. 12
Anticorpi e reagenti.....	pag. 13
Immunofluorescenza.....	pag. 14
SDS PAGE e western blot.....	pag. 16
Precipitazione di proteine con acido tricloroacetico...pag. 16	
Analisi dell'aggregazione di proteine.....	pag. 17
Velocity gradient.....	pag. 18
Gel filtration.....	pag. 19
Silver staining.....	pag. 19
Esperimenti di espressione e secrezione polarizzata...pag. 20	
RISULTATI.....	pag. 22
La proteina VGF ha caratteristiche tipiche	
delle granine.....	pag. 23
In cellule FRT la proteina VGF presente nei granuli	
non colocalizza con marker di endosomi, lisosomi ed	
enlargeosomi.....	pag. 25
In MDCK ed NIH3T3 la proteina VGF si accumula	
in granuli e non colocalizza con marker di endosomi	
e lisosomi.....	pag. 29
In cellule PC12 ed in cellule FRT la proteina VGF	
aggrega.....	pag. 31
Le proteine Tireoglobulina e PLAP non aggregano...pag. 33	
La proteina VGF si ritrova in aggregati ad alto	
peso molecolare.....	pag. 35
La proteina secreta nei terreni di coltura non forma	
aggregati.....	pag. 39

Negli aggregati proteici si ritrovano altre proteine oltre VGF.....	pag. 42
Flotillina 2 aggrega, ma non colocalizza con VGF.....	pag. 43
Silver staining della gel filtration.....	pag. 45
Gemmazione di granuli di VGF dal TGN.....	pag. 46
Il valore del pH è critico per la formazione di Granuli e per la secrezione della proteina VGF.....	pag. 49
Nella proteina VGF non vi è un singolo dominio responsabile della sua aggregazione.....	pag. 55
CONCLUSIONI.....	pag. 57
VGF è una granina.....	pag. 58
VGF aggrega.....	pag. 59
Meccanismo molecolare di aggregazione delle granine.....	pag. 60
VGF si trova in aggregati ad alto peso molecolare con altre proteine endogene.....	pag. 63
La proteina VGF è capace di indurre la formazione di granuli.....	pag. 64
L'aggregazione di VGF è rilevante per la sua secrezione regolata.....	pag. 67
VGF forma aggregati anche in cellule PC12.....	pag. 68
Conclusione.....	pag. 69
BIBLIOGRAFIA.....	pag. 71

INTRODUZIONE

Secrezione costitutiva e secrezione regolata

Nelle cellule di mammifero esistono due principali modalità di secrezione delle proteine: la secrezione costitutiva e quella regolata [1].

La secrezione costitutiva è comune a tutte le cellule e si realizza mediante piccole vescicole che trasportano proteine e lipidi in modo continuo e rapido dall'apparato di Golgi verso la membrana plasmatica [2].

La secrezione regolata è presente in cellule specializzate come le cellule endocrine, neuroendocrine ed i neuroni. La secrezione regolata avviene mediante organelli, che sono detti granuli secretori, che trasportano alla membrana plasmatica molecole bioattive come ormoni e neuropeptidi. Le proteine secretorie della via regolata si concentrano all'interno di granuli di grosse dimensioni che gemmano dal TGN, si accumulano all'interno della cellula ed in seguito ad uno stimolo fondono la loro membrana con la membrana plasmatica per riversare il contenuto nell'ambiente extracellulare [3-5].

Granuli secretori

Sin da quando sono stati scoperti al microscopio elettronico, i granuli secretori hanno attirato l'attenzione dei biologi sia perché sono gli organelli predominanti in cellule endocrine, neuroendocrine e neuroni, sia perché sono determinanti

affinché avvenga la secrezione regolata.

I granuli secretori hanno una morfologia tipica: sono organelli rotondeggianti, circondati da membrana, con un diametro di alcune centinaia di nanometri ed un contenuto denso al microscopio elettronico.

I granuli secretori originano nel trans-Golgi network (TGN) [6] e vengono inizialmente denominati granuli secretori immaturi poiché vanno incontro ad eventi successivi che li convertono in granuli secretori maturi [7, 8].

E' stato proposto che la biogenesi dei granuli secretori avvenga attraverso alcune tappe critiche: la progressiva aggregazione delle proteine e la loro segregazione in regioni specifiche del TGN, la gemmazione dal TGN di granuli secretori immaturi, la fusione dei granuli immaturi e le modificazioni a carico della membrana dei granuli secretori e del loro contenuto proteico [9].

Durante la maturazione dei granuli secretori può anche avere luogo il taglio dei precursori contenuti nei granuli, da parte di specifici enzimi, per la formazione di ormoni e neuropeptidi attivi. La fusione dei granuli secretori immaturi contribuisce alla condensazione del nucleo del granulo secretorio [10, 11].

Modelli di sorting

Sono stati proposti due modelli per spiegare come specifiche molecole destinate ai granuli secretori, e quindi alla via di

secrezione regolata, sono segregate da altre proteine secretorie. I due modelli non si escludono tra loro.

Un primo modello, conosciuto come 'sorting by entry', propone che la progressiva aggregazione delle proteine secretorie regolate, in modo particolare delle granine, sia favorita dall'alta concentrazione di Ca^{2+} e dal pH basso, inferiore a 6.5, in regioni specializzate del lume del TGN [12-14]. La precipitazione delle proteine regolate coinvolge anche proteine che non sono regolate e dà inizio alla formazione del granulo secretorio. Le interazioni tra granine, pro-ormoni ed enzimi proteolitici determinerebbe la ritenzione nei granuli secretori delle proteine regolate. L'ancoraggio di alcune granine ed alcuni enzimi proteolitici a rafts è considerato un'altra tappa critica per la segregazione in granuli. I granuli secretori acquisiscono uno specifico contenuto di proteine ed anche di enzimi proteolitici, ad esempio le pro-ormono convertasi 1 e 2 e la carbossipeptidasi E/H, e mostrano una specifica morfologia.

Il secondo modello di biogenesi dei granuli secretori è conosciuto come 'sorting by retention'. Questo secondo modello propone che proteine che non sono destinate alla secrezione regolata vengano trattenute ovvero riportate al TGN. Si ritiene che il processo di aggregazione delle granine coinvolga anche altre proteine secretorie che non devono essere secrete con modalità regolata, ma che sono incluse passivamente nei granuli secretori immaturi.

Il modello di 'sorting by retention' prevede che durante la maturazione dei granuli secretori vi sia una progressiva esclusione dal nucleo dei granuli immaturi delle proteine secretorie non destinate alla via regolata. Queste proteine verrebbero progressivamente rimosse dai granuli immaturi mediante vescicole rivestite di clatrina e dirette verso il pathway secretorio costitutivo. Recentemente è stato dimostrato che la proteina adattatore GGA recluta clatrina dai granuli immaturi ed è coinvolta nella maturazione dei granuli secretori in cellule neuroendocrine [15].

Le granine

Le granine rappresentano una famiglia di proteine secretorie di via regolata abbondanti nelle cellule neuroendocrine. E' stato proposto un ruolo decisivo di queste proteine nella biogenesi dei granuli secretori. E' stato dimostrato che se cromogranina A e B vengono iperespresse in fibroblasti formano strutture che possono essere definite granuli secretori non solo perché hanno la tipica morfologia dei granuli secretori presenti in cellule endocrine e neuroendocrine, ma anche perché hanno la capacità di esocitare il proprio contenuto in seguito ad uno stimolo [16]. La proprietà biofisica comune alle granine è quella di coaggregare a basso pH e ad alta concentrazione di Ca^{2+} . Questi aggregati formano un nucleo iniziale e probabilmente agiscono come veicolo per la precipitazione di altre proteine. E' stato

inoltre dimostrato che cgb presenta all'estremità N-terminale un ponte S-S che risulta essere il segnale per l'inclusione in granuli secretori. Ma se sono presenti proteine endogene regolate il ponte disolfuro può facilitare il sorting in granuli e non determinarlo in modo diretto [17].

Segnali di sorting

Fin dalla scoperta del recettore per il mannosio-6-fosfato, coinvolto nel trasporto delle idrolasi dal TGN ai lisosomi, si è investigato alla ricerca di un recettore equivalente per il sorting di proteine di via regolata. Nel 1997 è stato proposto l'enzima proteolitico Carbossipeptidasi E come recettore responsabile del sorting delle proteine incluse in granuli secretori [18]. Ma questa ipotesi è stata confutata quando è stato dimostrato che la ritenzione nel reticolo endoplasmatico di un mutante inattivo di CPE preclude il processing dei pro-ormoni, ma non la loro inclusione nei granuli secretori. Venne poi scoperto che una piccola parte del mutante inattivo sfuggiva alla ritenzione nel reticolo [19]. La disputa fu in parte risolta dall'analisi di topi $CPE^{-/-}$ che, nonostante la mancanza dell'informazione per la sintesi dell'enzima, erano capaci di sopravvivere suggerendo che il trasporto mediato dai granuli secretori non veniva compromesso [20].

VGF

L'attenzione sulla proteina VGF si è molto accresciuta quando è stato generato il topo knockout per VGF che è risultato essere piccolo, ipermetabolico, iperattivo ed infertile, con marcata riduzione dei livelli di leptina e di grasso corporeo. E' stato dimostrato che il gene che codifica per la proteina VGF è coinvolto nella regolazione dell'omeostasi energetica [21]. Il gene è stato inizialmente identificato in cellule PC12 dove è indotto da NGF [22], ma è stato dimostrato che può essere indotto anche da BDNF e neurotrofina 3 e marginalmente anche da fattori di crescita dell'epidermide e dei fibroblasti, IL-2 ed insulina [23, 24]. Il gene codifica per una proteina di 617 aa che viene processata per generare una serie di neuropeptidi non ancora completamente identificati [25]. In vivo la proteina VGF è stata descritta in neuroni della corteccia, dell'ipotalamo, dell'ippocampo e del sistema olfattorio, [26]. In cellule PC12 VGF è localizzata in granuli secretori a nucleo denso [27] ed è secreta in risposta a vari stimoli [28].

Scopo del lavoro

Uno degli aspetti di maggiore interesse nel meccanismo che determina la secrezione regolata di proteine è capire cosa determina l'inizio della biogenesi dei granuli secretori e come specifiche proteine vengono incluse in questi granuli.

E' stato proposto che nel TGN è presente un'alta concentrazione di Ca^{2+} e un ph basso e che tali condizioni sono critiche per la formazione di granuli secretori. Le proteine maggiormente rappresentate nei granuli secretori sono le granine ed è stato dimostrato che in un mezzo ad alta concentrazione di Ca^{2+} e ph acido le granine hanno la capacità di aggregare [12, 29-31]. La proprietà tipica delle granine di aggregare e la loro abbondanza nei granuli secretori ha indotto ad ipotizzare e ad indagare su di un loro coinvolgimento nella biogenesi dei granuli.

E' stato dimostrato che le granine sono determinanti per il corretto assemblaggio dei granuli secretori, ma ancora molti aspetti sono da chiarire sul ruolo di queste proteine e lo studio delle granine appare essenziale per capire il meccanismo di biogenesi dei granuli secretori della via regolata.

In questa tesi abbiamo voluto indagare sulla proteina secretoria VGF. Abbiamo studiato le caratteristiche di questa proteina e cercato di individuare un possibile coinvolgimento della proteina VGF nella biogenesi dei granuli secretori.

MATERIALI E METODI

Culture cellulari e trasfezioni

Cellule epiteliali di tiroide di ratto Fischer (FRT) sono state coltivate in piastre di plastica (Falcon) di 100 mm di diametro, mantenute in incubatore a 37°C, in un'atmosfera umidificata contenente il 95% di aria ed il 5% di CO₂. Coltivate in terreno Ham F12 modificato da Coon (Euroclone) contenente il 5% di siero fetale bovino (GIBCO).

Le cellule FRT trasfettate stabilmente con i cDNA di VGF, PLAP (fosfatasi alcalina placentale) e Tg (tireoglobulina) sono state coltivate in presenza di G418 (250 µg/ml). Le cellule FRT-VGF e FRT-PLAP sono state ottenute come descritto [32, 33]. Le cellule FRT-Tg sono state ottenute mediante trasfezione con FuGENE 6 del cDNA codificante per la Tg bovina [34].

Plasmidi

Il DNA che codifica per la forma completa di VGF è un frammento PvuII-XbaI del plasmide genomico VGF8 clonato nel vettore pcDNA.3 (Invitrogen, Groningen, Netherlands) sotto il promotore CMV.

I vettori di espressione che codificano per i frammenti di VGF che presentano il Myc-Tag sono stati costruiti partendo dal plasmide pSecTag2 (Invitrogen), utilizzando siti di restrizione presenti nel cDNA di VGF. I vettori pSecTag2 (Frame A, B, C) hanno nella porzione N-terminale la sequenza leader per la

traslocazione nel RER e all'estremità C-terminale l'epitopo di Myc. Ogni costrutto è in frame con il leader e il tag.

Sono stati creati i seguenti costrutti:

VGF 67-611 è un frammento EcoRI di VGF cDNA (dall'aa 67 all'aa 611) subclonato in pSecTag2 B.

VGF 80-450 è un frammento BamHI di VGF cDNA (dall'aa 80 all'aa 450) subclonato in pSecTag2 A.

VGF 80-285 è un frammento XhoI del vettore di VGF 80-450 tagliato e rilegato nello stesso vettore.

VGF 286-450 è un frammento XhoI di VGF 80-450 subclonato in pSecTag2 C.

VGF 450-611 è un frammento BamHI-EcoRI di VGF cDNA (dall'aa 450 all'aa 611) subclonato in pSecTag2 A.

Il vettore di espressione della forma secretoria di p75^{NTR} è stato preparato da André Le Bivic (CNRS Marseille-France).

Il cDNA codificante per Tg bovina proviene dai laboratori di Peter Arvan.

Il DNA dei plasmidi è stato purificato con il kit Qiagen (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany).

Anticorpi e Reagenti

-Antisiero policlonale di coniglio contro il peptide carbossi-terminale di VGF (573-617) [35] è stato usato sia per immunofluorescenza (1:1500) che per immunoblotting (1:3000 o 1:20000).

- Antisiero policlonale contro il peptide di VGF (4-240) è stato usato solo per immunofluorescenza [27].
 - Anticorpi monoclonali di topo anti-c-Myc umano, clone 9E10 e contro Lamp 1 (Santa Cruz Biotechnology).
 - Anticorpo monoclonale, clone ME 20.4, ottenuto contro l'ectodominio del recettore della neurotrofina umana p75^{NTR} dono di André Le Bivic (Università di Marsiglia, Francia).
 - Anticorpi policlonali e monoclonali contro tireoglobulina (Neomarker).
 - Anticorpi contro PLAP: (monoclonale Sigma; policlonale Rockland).
 - Anticorpi monoclonali di topo contro TGN38, GRP94 e KDEL (Affinity Bio Reagents Inc).
 - Anticorpi monoclonali contro EEA1 e Flotillina 2 (B.D. - Transduction Laboratories).
 - Anticorpi secondari per immunoblotting anti-mouse e anti-rabbit coniugati con la perossidasi di rafano (Amersham Pharmacia-Buckinghamshire, UK).
 - Anticorpi secondari per immunofluorescenza indiretta anti-mouse e anti-rabbit, ALEXA Fluor 488 o 543 e colorante vitale (Lisotracker) per colorare i lisosomi (Molecular Probe).
- La Bafilomicina A1 è della ditta Calbiochem.
- Tutti gli altri reagenti, se non diversamente specificato, sono della Sigma.

Immunofluorescenza

Le molecole d'interesse sono state visualizzate mediante immunofluorescenza indiretta.

Cellule coltivate su vetrini coprioggetto di 12 mm di diametro sono state fissate in 4% paraformaldeide in PBS; lavate due volte per 5 minuti con una soluzione 50mM di NH_4Cl ; permeabilizzate, a seconda delle esigenze sperimentali, o con una soluzione allo 0,075% (due lavaggi di 10 minuti) o con Triton X-100 0,3% in PBS (3 minuti). In alternativa le cellule sono state fissate e permeabilizzate con una miscela 1:1 di metanolo e acetone per 3 minuti a -20°C .

Dopo un'incubazione di 20 minuti in una soluzione contenente o 0.2% gelatina o 1% BSA (Albumina serica bovina) in PBS, le cellule sono state incubate in camera umida con gli anticorpi primari; dopo tre lavaggi di 10 minuti le cellule sono state incubate in camera umida con gli anticorpi secondari coniugati ai fluorocromi Alexa Fluor 488 o 543. Le osservazioni sono state effettuate ad un microscopio a scansione laser confocale Zeiss LSM 510. La lunghezza d'onda del laser ad Argon era settata a 488 nm; quella del laser HeNe era settata a 543 nm. L'emissione di fluorescenza è stata rivelata da un filtro BP 5205-530 per l'Alexa fluor 488 e da un filtro BP 560-615 per l'Alexa fluor 543. Doppie immunocolorazioni sono state acquisite simultaneamente nel canale verde ed in quello rosso alla risoluzione di 1024x1024 pixels.

SDS PAGE e Western Blot

I terreni senza siero venivano raccolti dopo i tempi di incubazione sperimentali, pipettati in tubi eppendorf, brevemente centrifugati per eliminare eventuali cellule morte e conservati in ghiaccio.

Le cellule venivano lavate due volte con PBS freddo; lisate 20 minuti a 4°C in TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5) contenente 1% Triton-X100 e inibitori di proteasi (leupeptin, antipain, pepstatin e aprotinin). Ai lisati ed ai terreni veniva aggiunto Laemmli sample buffer 5x. I campioni venivano bolliti per 5 minuti e corsi su SDS-PAGE al 10%. Dopo la corsa elettroforetica le proteine venivano elettrotrasferite su filtro o di nitrocellulosa o di PVDF. I filtri venivano bloccati in TBS 5% NFD (Non Fat Dry Milk) per un'ora a temperatura ambiente, abbondantemente lavati in TTBS e in TBS e cimentati con gli anticorpi primari. Dopo abbondanti lavaggi in TTBS e in TBS i filtri venivano incubati con gli anticorpi secondari anti-coniglio o anti-topo coniugati alla perossidasi di rafano. Le bande proteiche specifiche immunodecorate dagli anticorpi venivano rivelate per chemiluminescenza o con il sistema ECL (GE Amersham) o con quello Femto detection reagent (Pierce).

Precipitazione di proteine con acido tricloracetico (TCA)

Si portano i campioni sperimentali ad una concentrazione di TCA al 20%; si incubano in ghiaccio in camera fredda per 2 ore; si centrifugano a 14,000 rpm a 4°C per 30 minuti; si aspira il sovrnatante e si aggiunge 1ml di acetone freddo ai campioni che vengono agitati e centrifugati nuovamente a 14,000 rpm a 4°C per 15minuti. Questa operazione si ripete due volte.

Si aspira il sovrnatante e si lascia evaporare l'acetone residuo sotto un flusso d'aria; si risospende il pellet con Laemmli sample buffer 2X; si incubano i campioni in agitazione sul termomixer a 32°C per 5minuti; si neutralizza il pH con vapori di ammoniaca sotto campana.

Analisi dell'aggregazione di proteine

Per l'esperimento di aggregazione sono stati utilizzati tre differenti buffer di lisi: buffer aggregante (A), buffer non aggregante (NA) e buffer riaggregante (RIA).

Buffer A: 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100.

Buffer NA: 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100.

Si lavano due volte le cellule con PBS freddo. Si lisano le cellule cresciute in tre differenti piastre con i tre diversi buffer (A, NA e RIA) 1ml/piastra ma senza Triton X100 e con inibitori di proteasi.

Si screpano le cellule su ghiaccio e si raccolgono in tubi eppendorf da due ml. Si omogenizza con un ago 23G passando le cellule per 15 volte attraverso l'ago. Si porta il tutto a 1% Triton X-100. I campioni si incubano in rotazione per 20 minuti a 4°C. Si inseriscono in tubi da ultracentrifuga e si incubano per 15 minuti in ghiaccio. Si centrifuga a 45,000 rpm per 15 minuti a 4°C (rotore TL100 BECKMAN).

Si conservano i sovranatanti che saranno la parte solubile dei lisati identificati come **S** e i pellet (**P**) vengono risospesi in 1 ml di buffer A o NA con una siringa. Il campione contenente il buffer A viene diluito con 1ml dello stesso buffer, così anche il campione contenente il buffer NA viene diluito con il proprio buffer. I campioni vengono incubati in ghiaccio 15 minuti. I campioni vengono centrifugati a 45,000 rpm per 15 minuti a 4°C. Dopo la centrifugazione si raccolgono i sovranatanti e i pellet vengono risospesi in 1ml di buffer NA con una siringa. A questo punto i campioni vengono analizzati mediante SDS-Page e Western Blot.

Velocity gradient

Le cellule sono cresciute all'80% di confluenza in piastre da 100 mm di diametro, lavate con PBS e lisate in ghiaccio per 30 minuti in 20mM Tris, pH7.4, 100mM NaCl. 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100. Si screpano le cellule e si omogenizzano con una ago 26 G per 15 volte. Si pellettano i nuclei per

centrifugazione ed i campioni vengono caricati su un gradiente di densità di saccarosio (5-30%). Si ultracentrifuga a 45,000 rpm per 16h (rotore SW50; Beckman Coulter). Si raccolgono frazioni di 500 µl dall'estremità superiore del gradiente, si TCA precipitano. Si caricano su SDS-PAGE al 10%, si trasferiscono su filtro di nitrocellulosa e le proteine specifiche sono rilevate mediante Western Blot usando specifici anticorpi.

Gel filtration o cromatografia ad esclusione molecolare

Le cellule FRT-VGF si lisano in buffer 20mM Tris, pH7.4, 100mM NaCl. 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100 per 30 minuti in ghiaccio.

I lisati cellulari si omogenizzano con una ago 23 G e, dopo che i nuclei sono stati pellettati per centrifugazione, 250 µl di sovrantante sono caricati su una colonna Sephadex 6HR 10-30 per cromatografia ad esclusione molecolare (Amersham). Il flow rate è stato settato a 0.5 ml/min e 28 frazioni di 0.5 ml sono state raccolte. Ogni frazione è stata TCA precipitata e analizzata mediante SDS-PAGE. Le proteine sono state rilevate mediante Western Blot usando specifici anticorpi.

Silver staining

Il gel è stato fissato in una miscela di metanolo, acido acetico e acqua (40:10:50) per 30 min, lavato con acqua per 1 ora,

incubato per 2 min in sodio tiosolfato 0,02% in acqua, lavato rapidamente con acqua, incubato per 40 min. in una soluzione di AgNO_3 (0,1 gr in 100 ml di acqua), lavato con acqua, sviluppato con una soluzione 0,04% di formaldeide e 2% sodio carbonato) e lo sviluppo è stato bloccato con una soluzione di acido acetico all'1%.

Esperimenti di espressione e di secrezione polarizzata

Le cellule sono state coltivate in piastra da 100 mm o da 35 mm e su filtro in un sistema bicamerale. I terreni di coltura privi di siero sono stati raccolti e messi in tubi eppendorf con inibitori di proteasi. Le cellule, sono state lisate in TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5) contenente 1% Triton-X100 e inibitori di proteasi a 4°C in agitazione. Negli esperimenti di secrezione polarizzata le cellule coltivate su filtro, vengono incubate in terreno senza siero per i tempi sperimentali di secrezione, scaduti i quali i terreni si raccolgono in tubi eppendorf ed i filtri escissi dal supporto ed inseriti in tubi contenenti il buffer di lisi. I tubi vengono incubati a 4°C in agitazione.

Tutti i campioni vengono centrifugati per 15 minuti a 4°C in centrifuga Eppendorf a 14000 rpm (20800 rcf). I sovranatanti sono trasferiti in un tubi nuovi.

I campioni sono solubilizzati in Laemmli sample buffer 5X e bolliti 5 minuti e caricati su SDS-PAGE al 10%. Le proteine si

trasferiscono su un filtro di polyvinylidene fluoride (PVDF) Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA) e si rivelano per chemiluminescenza dopo Western Blotting.

RISULTATI

La proteina VGF ha caratteristiche tipiche delle granine

VGF è una proteina di circa 90 kDa che è stata identificata inizialmente in cellule di feocromocitoma di ratto PC12 dove la sua trascrizione è indotta da NGF [36]. L'attenzione su questa proteina è aumentata quando è stato osservato che i topi knock-out per il gene di VGF sono magri, ipermetabolici e resistenti a vari tipi di obesità [37]. Nel cervello di ratto VGF è abbondante nei neuroni della corteccia, dell'ipotalamo, dell'ippocampo e del sistema olfattorio, dove la proteina viene accumulata all'interno di granuli secretori, che vengono trasportati verso l'assone per essere secreti in seguito ad uno stimolo [26].

Il c-DNA che codifica per la proteina VGF è stato trasfettato nelle cellule tiroidee di ratto FRT. Sono stati ottenuti cloni stabili di cellule FRT-VGF ed è stato verificato che queste cellule sintetizzassero e secernessero nel terreno di coltura una proteina del peso molecolare atteso e riconosciuta sia in western blot che in immunofluorescenza da anticorpi specifici anti VGF [32].

Abbiamo ipotizzato che VGF potesse avere proprietà simili a quelle delle granine, una famiglia di proteine della via secretoria regolata a cui è stato attribuito un ruolo fondamentale nella formazione di granuli secretori in cellule neuroendocrine.

Le granine condividono alcune caratteristiche comuni quali: presenza di numerosi amminoacidi acidi, presenza di numerosi residui di prolina, presenza di una sequenza consenso, un punto

isoelettrico basso compreso tra 4.8 e 5.2 ed una elevata termostabilità [38].

La presenza di numerosi residui acidi e di prolina nella catena amminoacidica della proteina VGF ci ha indotto a chiederci se VGF avesse altre caratteristiche tipiche delle granine e se potesse essere essa stessa considerata una granina.

E' stato misurato, mediante il programma Compute pI/MW di ExPASy Proteomics Server dell'istituto di bioinformatica di Ginevra, il punto isoelettrico teorico di VGF ed è stato trovato che esso è circa 5, quindi un valore basso e nel range dei valori considerati tipici delle granine.

Le granine sono termostabili e, se vengono bollite in un buffer a pH neutro, non precipitano. Questa proprietà non è molto comune tra le proteine ed abbiamo pertanto valutato la termostabilità della proteina VGF. Abbiamo lisato le cellule FRT-VGF nel buffer Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 ed abbiamo risospeso nello stesso buffer le proteine secrete nel terreno di coltura, dopo averle concentrate in tubi Amicon Ultra (Millipore). Abbiamo bollito entrambi i campioni proteici, lisato cellulare e terreno di coltura, per 5 minuti a 100°C. L'analisi mediante SDS-PAGE e Western Blot ha dimostrato che la proteina VGF, anche dopo bollitura dei campioni, non precipita e continua ad essere presente nel sopranatante sia dei lisati cellulari che dei terreni di coltura (Fig 1).

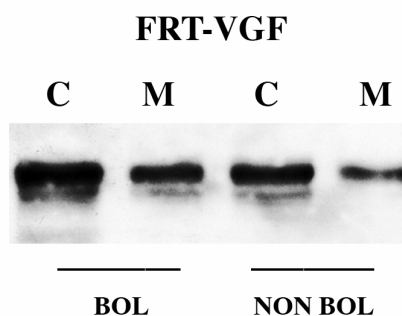


Fig.1

Cellule FRT-VGF sono state lisate nel buffer Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Le proteine secrete nel terreno di coltura sono state concentrate in tubi e risospese in buffer Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4. Entrambi i campioni proteici, lisato cellulare e terreno di coltura, sono stati bolliti per 5 minuti a 100°C e caricati su un gel di poliacrilammide al 10%.

Da queste osservazioni concludiamo che la proteina VGF presenta caratteristiche tipiche delle granine e può essere verosimilmente considerata una granina.

In cellule FRT la proteina VGF presente nei granuli non colocalizza con marker di endosomi, lisosomi ed enlargeosomi

Dopo trasfezione stabile in cellule FRT è apparso subito evidente che la proteina VGF veniva inclusa in granuli e secreta con modalità regolata. Per giungere a questa conclusione le cellule FRT-VGF sono state colorate mediante immunofluorescenza indiretta con un anticorpo che riconosce in modo specifico VGF. Nelle cellule si osserva un compartimento puntiforme distribuito sia nella zona perinucleare che in tutto il citoplasma. L'osservazione al microscopio elettronico ha permesso di constatare che il compartimento puntiforme in cui è inclusa VGF in cellule FRT è costituito da granuli secretori con un nucleo denso e con un diametro di 100-200 nm. Quando le cellule sono trattate con cicloesimide, che blocca la sintesi proteica, i granuli permangono all'interno per alcune ore. Inoltre l'esocitosi dei granuli può essere stimolata dal secretagogo PMA. Queste caratteristiche del compartimento granulare in cui è inclusa VGF in cellule FRT sono tipiche dei granuli secretori della via regolata [32].

Per determinare se effettivamente la proteina VGF fosse localizzata in granuli secretori ed escludere la possibilità che fosse presente in compartimenti deputati ad altro tipo di trasporto, le cellule FRT-VGF sono state colorate mediante doppia-immunofluorescenza indiretta con un anticorpo diretto contro la proteina stessa e con un anticorpo diretto contro la proteina EEA1, che è una componente specifica degli endosomi precoci [39]. L'analisi al microscopio confocale ha dimostrato

che in cellule FRT la proteina VGF non colocalizza con EEA1 e quindi non è contenuta in endosomi precoci (Fig. 2A).

Per verificare che VGF non fosse presente in lisosomi, abbiamo trattato le cellule FRT-VGF con Lisotracker, un fluoroforo che si lega ad una base debole parzialmente protonata a pH neutro e colora specificamente lisosomi il cui pH è acido. Anche in questo caso l'analisi al microscopio confocale ha rivelato che i granuli secretori in cui viene inclusa la proteina VGF non hanno caratteristiche di lisosomi (Fig. 2B).

E' stata anche valutata la possibilità che la proteina VGF fosse localizzata in strutture vescicolari, recentemente individuate, che sono state denominate enlargeosomi [14, 40]. Gli enlargeosomi sono vescicole che, in cellule PC12, trasportano alla membrana plasmatica i componenti strutturali necessari al rimodellamento e alla funzionalità della stessa. Le cellule FRT ed FRT-VGF sono state colorate mediante immunofluorescenza indiretta con l'anticorpo che riconosce desmoyokin-AHNAK (d/A), proteina marker degli enlargeosomi [40]. L'analisi al microscopio confocale ha permesso di determinare che in cellule FRT è presente la proteina d/A e che essa è localizzata in vescicole di piccole dimensioni. Mediante doppia immunofluorescenza in cellule FRT-VGF abbiamo osservato che VGF non colocalizza con d/A e che i due compartimenti dove sono incluse le due proteina sono distinti (Fig. 2C).

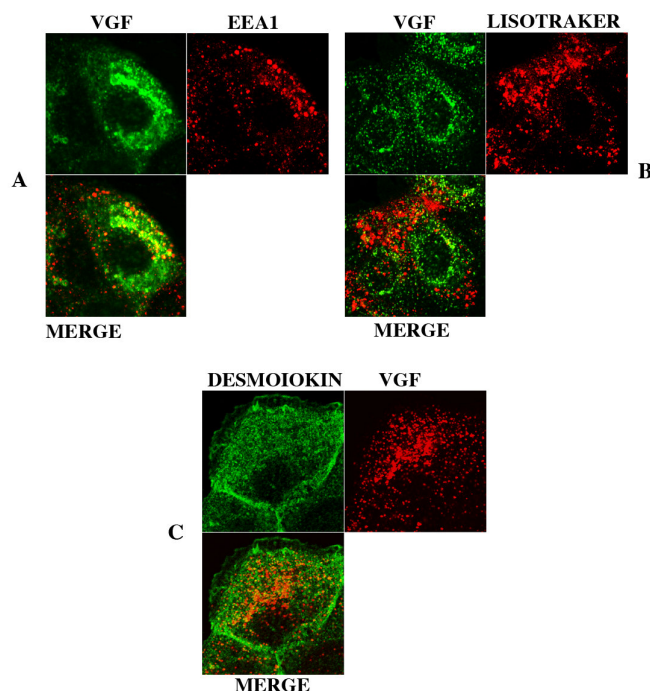


Fig. 2

Cellule FRT-VGF sono state coltivate su vetrini coprioggetto con un diametro di 12 mm. Sono state fissate e permeabilizzate con metanolo e acetone (1:1) e incubate con l'anticorpo policlonale contro VGF (1:1500) e contemporaneamente con l'anticorpo monoclonale contro EEA1(1:500) (Fig. 2A). Cellule FRT-VGF coltivate su vetrino sono state incubate con lisotracker per 30 min a 37°C che colora di rosso in vivo i lisosomi. Sono state fissate e permeabilizzate con metanolo e acetone. Sono state incubate con l'anticorpo contro VGF (Fig.2B).

Cellule FRT-VGF sono state incubate con l'anticorpo contro VGF e contemporaneamente con l'anticorpo contro desmoyokin-AHNAK (gentilmente regalato da Jacopo Meldolesi) .

In cellule MDCK ed NIH3T3 la proteina VGF si accumula in granuli e non colocalizza con marker di endosomi e lisosomi

L'espressione della proteina VGF in cellule FRT ha rivelato la presenza in queste cellule di un compartimento granulare della via secretoria regolata. Se ciò può apparire sorprendente dal momento che le cellule FRT esprimono un fenotipo non differenziato e pertanto la presenza di una via di secrezione regolata non è attesa, si deve tuttavia considerare che queste cellule derivano dalla tiroide [41] e cioè da un tessuto neuroendocrino in cui non si può escludere la capacità di effettuare secrezione regolata, in vivo.

Le similitudini tra VGF e le granine ci hanno indotto a sospettare un eventuale coinvolgimento della proteina VGF nella promozione della biogenesi dei granuli secretori.

Per verificare se effettivamente la proteina VGF sia capace di indurre, ex novo, la formazione di un compartimento granulare in cellule che normalmente non esprimono capacità di secrezione regolata, abbiamo trasfettato il cDNA che codifica per la proteina VGF in cellule di rene di cane MDCK ed in fibroblasti NIH3T3, due linee cellulari la cui funzione fa ritenere che non abbiano il macchinario per formare granuli secretori. L'osservazione al microscopio confocale ha dimostrato che l'anticorpo specifico contro la proteina VGF riconosce in entrambe le linee cellulari, MDCK (Fig. 3A) ed

NIH3T3 (Fig. 3C), un compartimento costituito da granuli simili a quelli delle cellule FRT.

Abbiamo verificato che i granuli non fossero endosomi precoci o lisosomi colorando le cellule MDCK mediante immunofluorescenza indiretta con l'anticorpo contro EEA1 per marcare endosomi precoci (Fig. 3A) e trattandole con lisotraker per evidenziare i lisosomi (Fig. 3B). L'analisi al microscopio confocale ha rilevato che i granuli che si sono formati in seguito alla trasfezione della proteina VGF in cellule MDCK non colocalizzano nè con endosomi precoci nè con lisosomi.

Nelle cellule NIH3T3 abbiamo colorato il compartimento lisosomiale utilizzando un anticorpo contro LAMP 1, una proteina presente nella membrana dei lisosomi [42]. Anche nei fibroblasti la proteina VGF non appare contenuta in lisosomi (Fig. 3C).

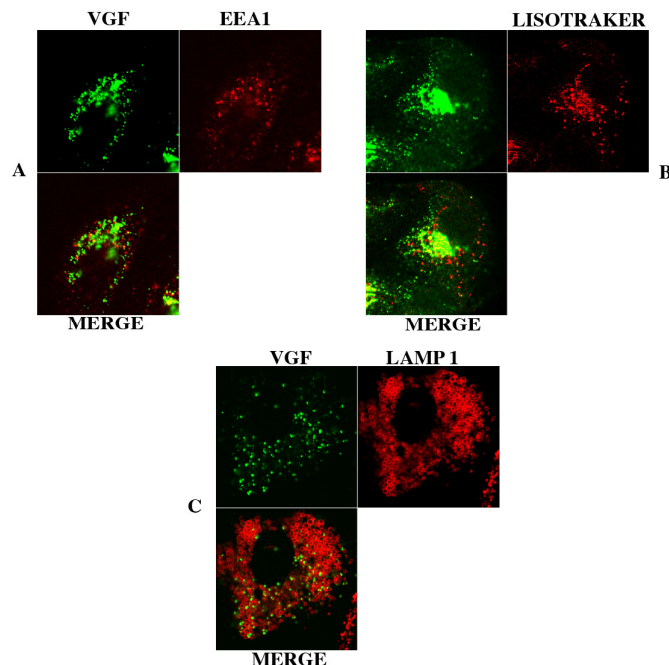


Fig. 3

Cellule MDCK-VGF sono state coltivate su vetrini coprioggetto con un diametro di 12 mm. Sono state fissate e permeabilizzate con metanolo e acetone (1:1) e incubate con l'anticorpo policlonale contro VGF (1:1500) e contemporaneamente con l'anticorpo monoclonale contro EEA1(1:500) (Fig. 3A). Cellule MDCK-VGF coltivate su vetrino sono state incubate con lisotracker per 30 min a 37°C che colora di rosso in vivo i lisosomi. Sono state fissate e permeabilizzate con metanolo e acetone. Sono state incubate con l'anticorpo contro VGF (Fig. 3B).

Cellule NIH3T3 sono state incubate con l'anticorpo contro Lamp1(1:200) che riconosce una proteina della membrana dei lisosomi (Fig. 2C)

La conclusione di queste osservazioni è che la proteina VGF espressa in cellule epiteliali di rene di cane MDCK ed in fibroblasti NIH3T3 viene inclusa in strutture granulari.

Possiamo pertanto ipotizzare che, come altre granine [43], essa contenga l'informazione per generare granuli.

In cellule PC12 ed in cellule FRT la proteina VGF aggrega

Una importante proprietà biofisica comune alle granine è quella di coaggregare a basso pH e ad elevata concentrazione di Ca^{2+} , condizioni verosimilmente presenti nel TGN. Questa proprietà

potrebbe essere rilevante per indurre l'avvio del processo di biogenesi dei granuli secretori.

Ci siamo chiesti se anche la proteina VGF abbia la capacità di formare aggregati e se quindi si possa ipotizzare che questa proprietà sia critica nella gemmazione dei granuli secretori.

Per determinare se la proteina VGF abbia la tendenza a formare aggregati, le cellule FRT-VGF e PC12 sono state lisate con un buffer chiamato 'aggregante', ad elevata concentrazione di Ca^{2+} e basso pH, intorno a 6.4. Le cellule FRT-VGF e PC12 sono state anche lisate, per controllo, in un buffer detto 'non aggregante', privo di Ca^{2+} ed a pH 7.4. I campioni sono stati incubati per 15 min a 4°C e poi centrifugati per 15 min a 100,000 g. E' stato raccolto il sovrinatante ed il pellet è stato risospeso nello stesso buffer. I campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western blot. Sia in cellule FRT-VGF che in cellule PC12, nei campioni trattati con buffer di controllo non aggregante (NA), la proteina VGF si ritrova quasi esclusivamente nel sovrinatante (S), laddove sono presenti proteine solubili. Nei campioni trattati con buffer aggregante (A) la proteina VGF è, al contrario, presente solo nella frazione costituita dal pellet (P) (Fig. 4).

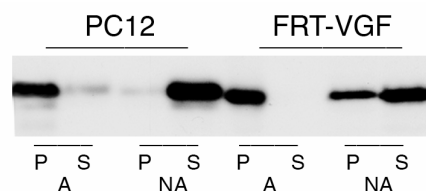


Fig. 4

Cellule PC12 trattate per 7 giorni con NGF e cellule FRT-VGF sono state coltivate in piastra da 100 mm e lisate per 20 min. In 0,5 ml di buffer aggregante (A): 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl_2 , pH6.4, 1% Triton X-100 o 0,5 ml di buffer non aggregante (NA): 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio e centrifugati a 100000 g per 15 min. I sovranatanti (S) sono stati raccolti e i pellet (P) risospesi nei rispettivi buffer. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico e analizzate per SDS-PAGE e western blot.

In cellule PC12, pertanto, la proteina VGF endogena ha la capacità di aggregare. Questa capacità viene anche manifestata dalla proteina VGF espressa mediante trasfezione in cellule FRT.

Le proteine tireoglobulina e PLAP non aggregano

Per dimostrare che i risultati ottenuti in cellule FRT sulla capacità di VGF di aggregare non fossero dovuti ad un artefatto determinato dai buffer impiegati, abbiamo utilizzato la stessa metodologia con una proteina secretoria di controllo, la tireoglobulina (Tg) e con la proteina di membrana PLAP, che è una proteina con ancora GPI.

Le cellule FRT-Tg ed FRT-PLAP sono state lisate con un buffer 'aggregante' o 'non aggregante', i campioni sono stati

incubati per 15 minuti a 4°C e centrifugati per 15 minuti a 100,000 g. I sopranatanti (S) ed i pellet (P) sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e Western blot. Le proteine Tg e PLAP (Fig. 5) risultano presenti nei sopranatanti sia se vengono trattate con buffer aggregante (A) che con buffer non aggregante (NA).

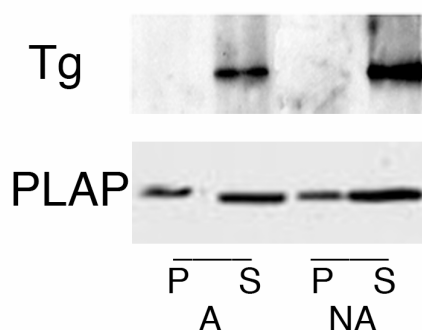


Fig 5

Cellule FRT-Tg e cellule FRT-PLAP sono state coltivate in piastra da 100 mm e lisate per 20 min. In 0,5 ml di buffer aggregante (A): 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100 o 0,5 ml di buffer non aggregante (NA): 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio e centrifugati a 100000 g per 15 min. I sovranatanti (S) sono stati raccolti e i pellet (P) risospesi nei rispettivi buffer. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico e analizzate per SDS-PAGE e western blot.

Concludiamo che la capacità di formare aggregati non dipende dalle condizioni sperimentali utilizzate ma da proprietà intrinseche della proteina VGF.

La proteina VGF si ritrova in aggregati ad alto peso molecolare

Per caratterizzare gli aggregati, e quindi i complessi ad alto peso molecolare, in cui si ritrova la proteina VGF in cellule FRT, abbiamo utilizzato tre differenti metodiche: il trattamento delle cellule con DSP, il velocity gradient e la gel filtration.

Il DSP, dithio-bis(succinimidyl propionate), è una molecola che forma legami S-S tra proteine che si trovano ad una distanza inferiore a 12 Å.

Le cellule FRT-VGF sono state lisate con Triton X-100. Al campione è stato aggiunto DSP fino a raggiungere una concentrazione finale di 50 mM. Metà del campione è stato bollito a 100°C in presenza di β -mercaptoetanolo per ridurre i ponti S-S. Le proteine del campione ridotto (RID) e di quello non ridotto (NON RID) sono state separate su SDS 6% PAGE.

Nel campione non ridotto, trattato con DSP, l'anticorpo contro la proteina VGF riconosce una serie di bande ad alto peso molecolare, superiore a 200 kDa, e non si osserva VGF all'altezza del peso molecolare atteso, come invece si osserva nel campione di controllo non trattato con DSP. Nei campioni

ridotti, trattati e non trattati con DSP, la proteina VGF migra con il peso molecolare atteso (Fig. 6A).

Per caratterizzare, con un differente approccio, i complessi ad alto peso molecolare in cui è presente VGF abbiamo utilizzato la metodica del velocity gradient. Questa metodica viene utilizzata per separare particelle che differiscono per peso, dimensioni e forma, sulla base della loro proprietà di sedimentare con differente velocità in un gradiente di saccarosio. Cellule FRT-VGF sono state lisate in un buffer contenente Triton X-100 ed SDS per solubilizzare completamente le membrane. Il lisato è stato caricato su un gradiente discontinuo di saccarosio 5-30% e sottoposto ad ultracentrifugazione. Sono state raccolte nove frazioni partendo dalla parte alta del gradiente, le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico ed analizzate mediante SDS-PAGE e western blot.

La proteina VGF risulta presente nelle frazioni ad alta densità di saccarosio, dove co-sedimentano proteine con un peso molecolare superiore a 200 kDa (Fig. 6B).

Un'ulteriore metodica applicata per caratterizzare gli aggregati formati dalla proteina è la gel filtration o cromatografia per esclusione molecolare. Questa metodica separa le molecole in base al peso, alla dimensione ed alla forma sfruttando la capacità delle molecole di passare o meno, e con differente velocità, attraverso i pori di un gel con porosità adeguata.

La gel filtration si avvale di colonne cilindriche nelle quali viene impaccato un gel che è in equilibrio con un solvente adatto alle molecole da separare. Il campione viene caricato dall'alto della colonna e le molecole in soluzione attraversano la colonna con velocità differente. Le molecole più grosse sono escluse dai pori e vengono eluite per prime mentre le altre molecole si distribuiscono lungo la colonna e vengono eluite con una velocità proporzionale al loro peso: le proteine più pesanti sono eluite prima di proteine più leggere.

Cellule FRT VGF sono state lisate con lo stesso buffer utilizzato per il velocity gradient. Il lisato è stato caricato su una colonna di sephadex HR10-30 e sono state raccolte 28 frazioni. I campioni sono stati TCA precipitati e le proteine caricate su SDS-PAGE.

La proteina VGF è presente dalle prime frazioni eluite, laddove si ritrovano proteine ad elevato peso molecolare, con un picco nelle frazioni 13-16. La sua forma monomerica è presente nelle frazioni 19-20 (Fig. 6C).

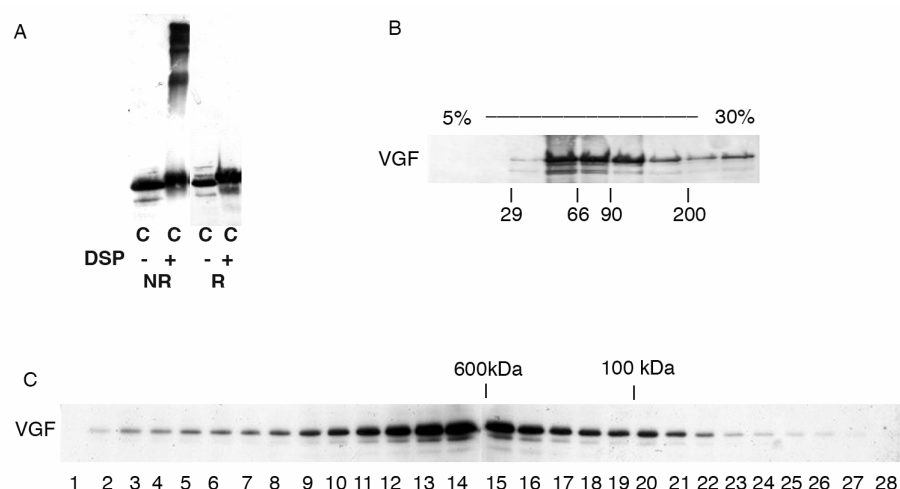


Fig. 6

Cellule FRT-VGF sono state lisate con Triton X-100. Al campione è stato aggiunto DSP fino a raggiungere una concentrazione finale di 50 mM. Metà del campione è stato bollito a 100°C in presenza di β -mercaptoetanolo per ridurre i ponti S-S. Le proteine del campione ridotto (RID) e di quello non ridotto (NON RID) sono state separate su un SDS-PAGE al 6% (Fig. 6A).

Le cellule, coltivate in piastre da 100 mm di diametro, sono state lisate in ghiaccio per 30 minuti in 20 mM Tris, pH7.4, 100 mM NaCl, 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100 e passate attraverso un ago 26 G per 15 volte. I nuclei sono stati eliminati mediante breve centrifugazione ed i campioni sono stati caricati su un gradiente di densità di saccarosio (5-30%). Si ultracentrifuga a 45000 rpm per 16h (rotore SW50; Beckman Coulter). Si raccolgono frazioni di 500 μ l dall'estremità

superiore del gradiente si TCA precipitano. Si caricano su SDS-PAGE al 10%.

La proteina VGF risulta presente nelle frazioni ad alta densità di saccarosio, dove co-sedimentano proteine con un peso molecolare superiore a 200 kDa (Fig. 6B). Cellule FRT-VGF sono state lisate in buffer 20mM Tris, pH7.4, 100mM NaCl, 0.4% SDS, 0.2% TRITON X-100 per 30 minuti in ghiaccio. I lisati cellulari sono stati omogenizzati con una ago 23 G, i nuclei sono stati pellettati per centrifugazione e 250 µl di sovrantante sono stati caricati su una colonna Sephadex 6HR 10-30 per cromatografia ad esclusione molecolare (Amersham). Il flow rate è stato settato a 0.5 ml/min e 28 frazioni di 0.5 ml sono state raccolte. Ogni frazione è stata TCA precipitata e analizzata mediante SDS-PAGE (Fig. 6C) e western blot contro VGF.

La conclusione di queste osservazioni è che la proteina VGF è presente in complessi ad elevato peso molecolare.

La proteina VGF secreta nei terreni di coltura non forma aggregati

Abbiamo determinato, utilizzando più tecniche, che la proteina VGF ha la capacità di formare aggregati, come avviene per altre granine. Ci siamo chiesti se nel meccanismo che determina l'aggregazione di VGF potessero intervenire altri fattori intracellulari o se la proteina stessa abbia questa capacità. Per

rispondere a questa domanda abbiamo concentrato la proteina secreta nei terreni di coltura e l'abbiamo poi diluita in buffer aggregante o non aggregante. In entrambi i tipi di buffer, all'analisi per SDS-PAGE e western blot, si osserva che la proteina secreta non forma aggregati (Fig. 7A).

Sembrerebbe pertanto che solo la proteina intracellulare sia capace di formare aggregati suggerendo o che la proteina secreta sia differente da quella intracellulare, forse a seguito di modifiche post-traduzionali, ovvero che l'interazione con altri componenti sia necessaria per la aggregazione di VGF e per la biogenesi dei granuli secretori.

Per quanto concerne modifiche post-traduzionali della proteina VGF non ne è stata a tutt'oggi dimostrata alcuna. E' stato al contrario dimostrato che la proteina VGF non è glicosilata. Noi stessi abbiamo effettuato esperimenti per verificare che VGF non fosse N-glicosilata trattando cellule FRT-VGF con tunicamicina (Fig 7B). Abbiamo osservato che la proteina continua ad essere secreta con lo stesso peso molecolare, indice che non vi è N-glicosilazione. Abbiamo comunque osservato un effetto indiretto dell'azione della tunicamicina. Infatti, mentre la proteina VGF in cellule FRT-VGF è sempre secreta dal dominio apicale (Fig. 7B), dopo trattamento con tunicamicina essa viene secreta in maniera non polarizzata sia dal dominio apicale che da quello basolaterale (Fig. 7C) suggerendo che qualche altra proteina, la cui glicosilazione è inibita dalla

tunicamicina, sia responsabile dell'alterazione della polarità di sorting.

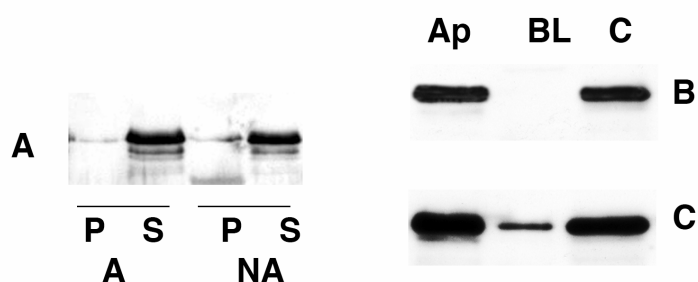


Fig.7

Cellule FRT-VGF sono state coltivate in piastra da 100 mm e incubate in mezzo di coltura senza siero per 16 ore. I mezzi sono stati raccolti e centrifugati in tubi vedere per concentrare le protine nel minor volume possibile. Ai campioni è stato aggiunto buffer aggregante (A) fino ad una concentrazione di 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100 o buffer non aggregante (NA) fino ad una concentrazione di 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio e centrifugati a 100000 g per 15 min. I sovranatanti (S) sono stati raccolti e i pellet (P) risospesi nei rispettivi buffer. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico e analizzate per SDS-PAGE e western blot (Fig. 7A).

Cellule FRT-VGF sono state coltivate su filtro in un sistema bicamerale per separare il mezzo di coltura apicale da quello basolaterale. Le cellule sono state coltivate per 18 ore in mezzo senza siero sia in presenza di tunicamicina (Fig. 7C) che in

assenza (Fig. 7B). I mezzi apicale (Ap) e basolaterale (BL) sono stati raccolti e le cellule lisate in TBS-1% triton X-100.

Per quanto concerne invece la possibilità che la proteina VGF interagisca con altri componenti molecolari, noi stessi abbiamo dimostrato che VGF si associa a componenti lipidiche, verosimilmente a rafts. nel suo percorso secretorio (Corteggio et al., unpublished) e che questa interazione potrebbe avere un ruolo nel meccanismo di formazione dell'aggregato e quindi nella biogenesi del granulo secretorio.

Negli aggregati proteici si ritrovano altre proteine oltre a VGF

Ci siamo chiesti se è possibile identificare, in cellule FRT-VGF, proteine endogene che hanno la capacità di aggregare con VGF. A questo scopo abbiamo trattato cellule FRT-VGF con buffer aggregante o non aggregante ed abbiamo caricato i campioni su un gel di poliacrilammide per analizzarli mediante silver staining (Fig. 8A). Questa colorazione ci ha permesso di evidenziare le più abbondanti proteine presenti sia nelle frazioni solubili che nei pellet. Tra i campioni trattati con buffer aggregante e quelli trattati con buffer non aggregante si rilevano differenze significative. In particolare vengono evidenziate alcune proteine endogene il cui peso molecolare suggerisce che possa trattarsi di componenti di vescicole secretorie. Tra queste,

una proteina di peso molecolare intorno a 40 kD, che ipotizziamo possa corrispondere alla flotillina 2 (FL2).

Fotillina 2 aggrega, ma non colocalizza con VGF

Abbiamo valutato la possibilità che la proteina osservata mediante silver staining fosse la proteina FL2 che è una proteina espressa in cellule PC12, ma che è stata trovata anche in altre linee cellulari [44]. Abbiamo analizzato le cellule FRT VGF trattate con buffer aggregante e non aggregante mediante SDS-PAGE e Western blot, utilizzando un anticorpo specifico contro FL2. Abbiamo osservato che la proteina è presente quasi esclusivamente nel pellet delle cellule trattate con buffer aggregante mentre è nelle frazioni solubili delle cellule trattate con buffer non aggregante (Fig. 8B). FL2 ha dunque la capacità di aggregare. Ci siamo chiesti se in cellule in coltura fosse localizzata negli stessi granuli di VGF. L'analisi al microscopio confocale di cellule FRT ed FRT-VGF colorate con lo stesso anticorpo anti-FL2 ha rivelato che la proteina VGF non colocalizza con FL2 (Fig. 8C).

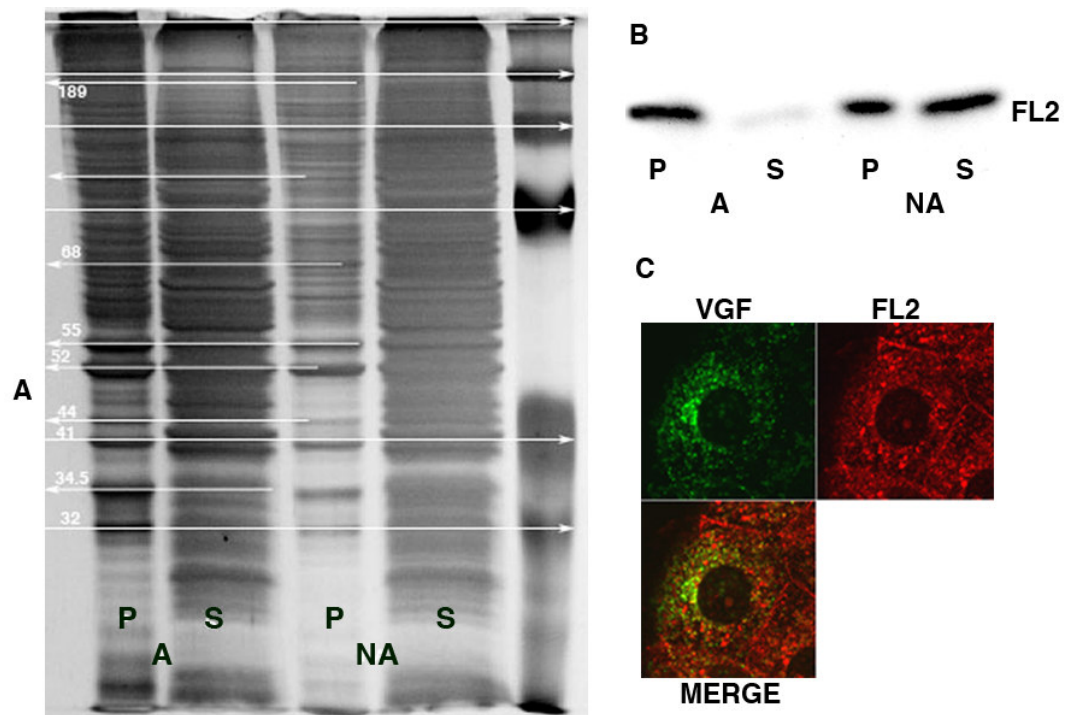


Fig. 8

Cellule FRT-VGF sono state coltivate in piastra da 100 mm e lisate per 20 min. In 0,5 ml di buffer aggregante (A): 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl_2 , pH6.4, 1% Triton X-100 o 0,5 ml di buffer non aggregante (NA): 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio e centrifugati a 100000 g per 15 min. I sovranatanti (S) sono stati raccolti e i pellet (P) risospesi nei rispettivi buffer. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico e analizzate per SDS-PAGE. Sono stati corsi due gel. Un gel è stato fissato in una miscela di metanolo, acido acetico e acqua (40:10:50) per 30 min, lavato con acqua per 1 ora, incubato per 2 min in sodio tiosolfato 0,02% in acqua, lavato rapidamente con acqua, incubato per 40 min. in una soluzione di AgNO_3 (0,1 gr in 100 ml di acqua), lavato con

acqua, sviluppato con una soluzione 0,04% di formaldeide e 2% sodio carbonato) e lo sviluppo è stato bloccato con una soluzione di acido acetico all'1%. Le proteine dell'altro gel sono state trasferite su nitrocellulosa ed analizzate mediante western blot con l'anticorpo contro FL2 (Fig 8B).

Cellule FRT-VGF sono state coltivate su vetrini coprioggetto con un diametro di 12 mm. Sono state fissate e permeabilizzate con metanolo e acetone (1:1) e incubate con l'anticorpo policlonale contro VGF (1:1500) e contemporaneamente con l'anticorpo monoclonale contro FL2(1:500) (Fig. 8C).

Silver staining della gel filtration

Per determinare se altre proteine venissero eluite insieme alla proteina VGF, abbiamo corso i campioni ottenuti dalla gel filtration su di un gel al 10% ed abbiamo evidenziato tutte le proteine mediante silver staining. Questo tipo di analisi ha dimostrato che un'unica proteina di 40 kDa viene eluita con VGF e che viene distribuita nelle frazioni allo stesso modo di VGF (Fig. 9)

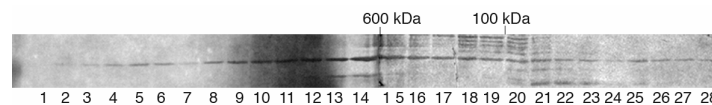


Fig.9

Le frazioni ottenute mediante gel filtration sono state caricate su un SDS PAGE al 10%. Il gel è stato fissato in una miscela di metanolo, acido acetico e acqua (40:10:50) per 30 min, lavato con acqua per 1 ora, incubato per 2 min in sodio tiosolfato

0,02% in acqua, lavato rapidamente con acqua, incubato per 40 min. in una soluzione di AgNO_3 (0,1 gr in 100 ml di acqua), lavato con acqua, sviluppato con una soluzione 0,04% di formaldeide e 2% sodio carbonato) e lo sviluppo è stato bloccato con una soluzione di acido acetico all'1%.

Gemmazione di granuli di VGF dal TGN

Nel modello di biogenesi dei granuli secretori che è attualmente più accreditato, il lume del TGN viene considerato il sito deputato alla formazione di aggregati di proteine destinate alla secrezione regolata. Questi aggregati verosimilmente interagiscono con la membrana del TGN per dare inizio alla gemmazione dei granuli.

Come già indicato, l'analisi mediante immunofluorescenza di cellule FRT-VGF con un anticorpo che riconosce in modo specifico VGF ci ha permesso di rilevare un compartimento granulare distribuito in tutto il citoplasma e nella zona perinucleare. Abbiamo indagato se la distribuzione perinucleare della proteina VGF fosse dovuta alla sua localizzazione nel reticolo endoplasmatico o nell'apparato di Golgi, in particolar modo nel TGN. Abbiamo colorato le cellule FRT-VGF mediante doppia-immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo contro la proteina VGF e l'uno o l'altro di due anticorpi contro proteine marker del reticolo endoplasmatico rugoso, KDEL (Fig. 10A) e GRP94 (Fig. 10B). Entrambe le proteine non co-

localizzano con VGF, indicando che il compartimento in cui è principalmente individuata la proteina VGF non è reticolo endoplasmatico.

Abbiamo successivamente utilizzato un anticorpo contro la proteina TGN38 che è una proteina integrale della membrana del TGN [45]. L'analisi al microscopio confocale, a basso ingrandimento, rileva che la proteina TGN38 delinea le cisterne del TGN e che vi è una parziale co-localizzazione tra VGF e TGN38 (Fig. 10C) .

Un'analisi a più alto ingrandimento delle cisterne positive per TGN38 rivela che i granuli secretori, che contengono VGF e che sono distribuiti nella zona peri-nucleare, sono molto frequentemente alla periferia delle cisterne del TGN e che le due proteine, laddove non co-localizzate, sono certamente adiacenti (Fig. 10D).

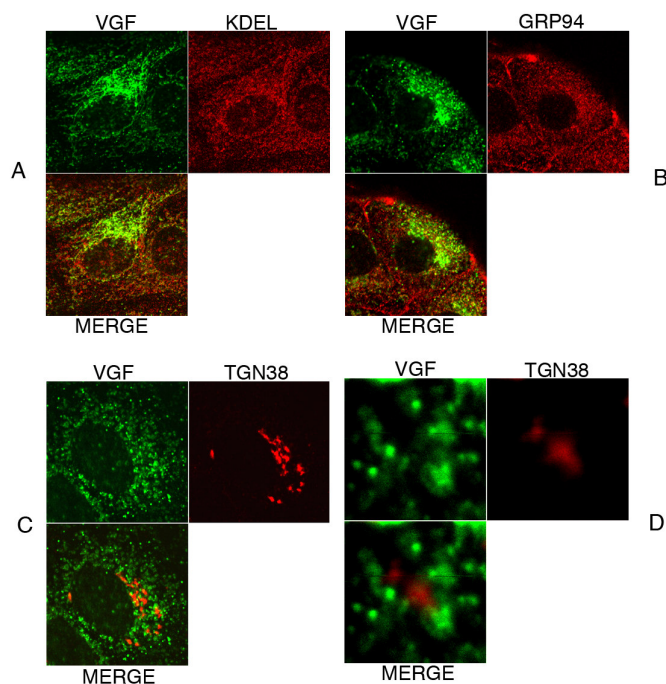


Fig. 10

Cellule FRT-VGF sono state coltivate su vetrini coprioggetto con un diametro di 12 mm. Sono state fissate e permeabilizzate con metanolo e acetone (1:1) e incubate con l'anticorpo policlonale contro VGF (1:1500) e contemporaneamente con l'anticorpo monoclonale contro KDEL (1:100) (Fig. 10A) oppure l'anticorpo monoclonale contro GRP94 (1:200) (Fig. 10B) oppure l'anticorpo monoclonale contro TGN38 (1:100) (Fig. 10C e 10D). Le cellule sono state osservate con microscopio confocale. Nella Fig. 10D è stato messo in evidenza un dettaglio della Fig. 10C.

L'assenza di co-localizzazione con markers del reticolo endoplasmatico e l'imperfetta co-localizzazione con compartimenti dell'apparato di Golgi ci inducono a ritenere che la proteina VGF intracellulare possa essere messa in evidenza, e cioè colorata da un anticorpo specifico, solo quando inizia ad aggregare e ad accumularsi in granuli secretori, in uscita dal TGN. In queste condizioni la proteina potrebbe o essere più concentrata, e quindi più facilmente rilevabile, oppure assumere una conformazione tale da essere riconosciuta dall'anticorpo.

I granuli secretori che si osservano molto numerosi intorno alle cisterne del TGN potrebbero rappresentare granuli che stanno gemmando o che sono appena gemmati dal TGN.

Il valore del pH è critico per la formazione di granuli e per la secrezione della proteina VGF

Il pH degli organelli lungo il pathway secretorio decresce progressivamente dal reticolo endoplasmatico al TGN ai granuli secretori.

E' stato dimostrato che il gradiente protonico si forma e viene mantenuto grazie ad una pompa protonica V-ATPase [46]. Vi sono evidenze che il gradiente di pH sia importante al livello del TGN perché avvenga una corretta ed efficiente biogenesi dei granuli secretori della via regolata. La perturbazione del pH in diverse linee cellulari determina effetti diversi, ma apparentemente sempre negativi rispetto alla secrezione di proteine della via regolata.

Ci siamo chiesti se in cellule FRT-VGF la perturbazione del gradiente protonico determinasse un'alterazione della secrezione della proteina VGF.

Per alterare il gradiente protonico abbiamo utilizzato un inibitore specifico della pompa protonica, la Bafilomicina A1 [47]. E' stato già dimostrato, in cellule PC12, che la Bafilomicina A1 interferisce specificamente nel pathway secretorio della proteina della via regolata CgA lasciando inalterata la secrezione di proteine della via secretoria costitutiva [46].

Abbiamo trattato cellule FRT-VGF con Bafilomicina A1 e contemporaneamente abbiamo utilizzato anche cellule FRT-Tg

ed FRT-PLAP per avere come controllo dell'esperimento due proteine secretorie che non vengono incluse nei granuli secretori di VGF.

Le cellule sono state coltivate in piastre dove era inserito un vetrino coprioggetto, per eseguire un'analisi mediante immunofluorescenza sulle stesse cellule su cui era effettuata l'analisi biochimica. Le cellule sono state trattate con Bafilomicina A1 ad una concentrazione di 10 nM per 22 ore e, dopo 16 ore di trattamento, veniva aggiunto nella piastra terreno senza siero, sempre contenente Bafilomicina A1, per determinare se vi fosse un'alterazione della secrezione. Dopo altre 6 ore di coltura è stato prelevato il vetrino dalla piastra, raccolto il terreno di coltura e le cellule sono state lisate.

I terreni di coltura ed i lisati cellulari sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e western blot.

Nelle cellule FRT-VGF trattate con Bafilomicina A1, la proteina VGF è presente nelle cellule in quantità ridotta rispetto al controllo, ma soprattutto non viene rilevata nei terreni di coltura (Fig. 11). Le proteine Tg e PLAP (Fig. 11) risultano invece presenti nelle stesse quantità nelle cellule e nei terreni di coltura delle cellule trattate e non trattate con Bafilomicina A1.

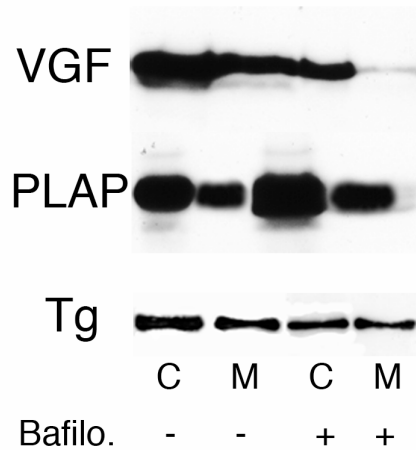


Fig. 11

Cellule FRT-VGF, FRT-Tg ed FRT-PLAP sono state coltivate in piastra e sono state trattate con Bafilomicina A1 ad una concentrazione di 10 nM oppure non trattate. Dopo 16 ore di trattamento, veniva messo nella piastra terreno senza siero, contenente o non contenente Bafilomicina A1. Dopo altre 6 ore di coltura è stato prelevato il mezzo e le cellule sono state lisate. I campioni sono stati analizzati mediante SDS PAGE e western blot con anticorpi contro VGF, Tg e PLAP.

Pertanto, la perturbazione del pH delle cellule FRT riduce drasticamente la secrezione della proteina VGF, mentre la secrezione delle proteine Tg e PLAP non subisce alterazioni. Il gradiente protonico è dunque importante per la secrezione della proteina VGF.

Ci siamo chiesti se il pH fosse rilevante anche per la biogenesi dei granuli secretori.

Le cellule coltivate sul vetrino, e trattate con Bafilomicina A1 contemporaneamente a quelle adese alla piastra, sono state colorate mediante doppia-immunofluorescenza con un anticorpo contro TGN38 ed analizzate col microscopio confocale. Nelle cellule FRT-VGF trattate con Bafilomicina A1 si osserva una marcata riduzione del numero dei granuli secretori che contengono VGF ed i pochi granuli residui sono organizzati in cluster. Inoltre, la proteina VGF non appare più localizzata prevalentemente nella zona peri-nucleare (Fig. 12A) ma il pattern complessivo di distribuzione di VGF appare modificato rispetto alle cellule di controllo (Fig. 12 B)

L'analisi della localizzazione della proteina TGN38 suggerisce che il compartimento del TGN si sia disorganizzato e frammentato perché non si osservano più le tipiche cisterne che costituiscono il TGN.

Per valutare se la Bafilomicina A1 avesse effetti sulla organizzazione dei microtubuli, che sono essi stessi responsabili dell'integrità dell'appato del Golgi, le cellule FRT-VGF, trattate o meno con Bafilomicina A1, sono state colorate mediante immunofluorescenza con un anticorpo anti-tubulina Al microscopio confocale si osserva che il citoscheletro di microtubuli appare inalterato (Fig. 12C) come per le cellule non trattate (Fig. 12D). La disorganizzazione del TGN, pertanto, non è determinata da un effetto della droga sui microtubuli.

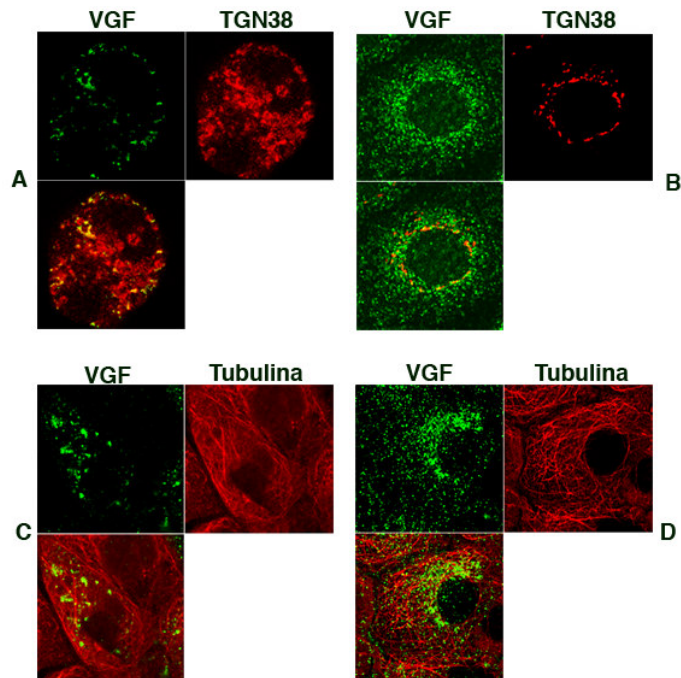


Fig. 12

Le cellule FRT-VGF coltivate sul vetrino contemporaneamente a quelle adese alla piastra, e trattate con Bafilomicina A1 (Fig. 12A e 12C) o non trattate (Fig. 12B e 12D), sono state colorate mediante doppia-immunofluorescenza con un anticorpo contro VGF contemporaneamente con un anticorpo contro TGN38 o con un anticorpo contro Tubulina ed analizzate col microscopio confocale.

Analizzando la distribuzione di Tg (Fig. 13A) e PLAP (Fig. 13B) si rileva che i compartimenti vescicolari che contengono queste due proteine restano sostanzialmente immutati anche dopo trattamento con Bafilomicina A1 sia per Tg (Fig. 13C) sia per PLAP (Fig. 13D).

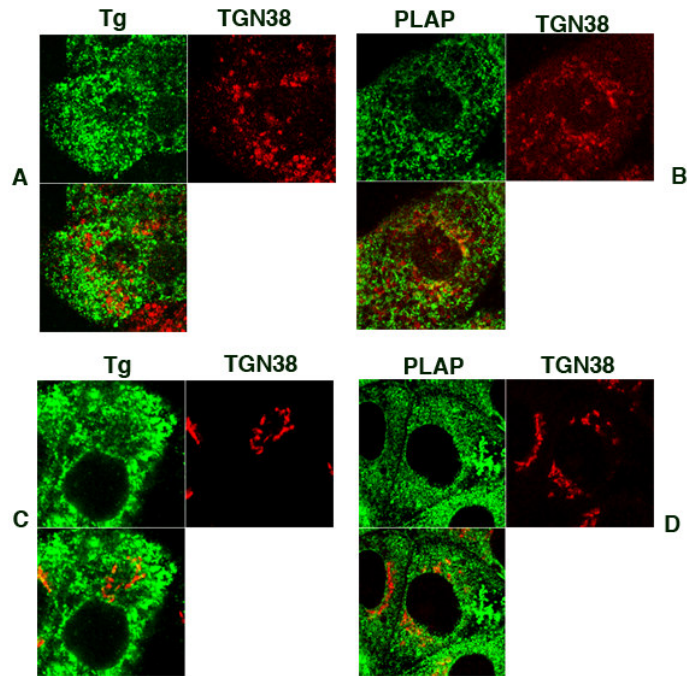


Fig. 13

Le cellule FRT-Tg ed FRT-PLAP coltivate sul vetrino contemporaneamente a quelle adese alla piastra, e trattate con Bafilomicina A1 (Fig. 13A e 13B) o non trattate (Fig. 12C e 12D), sono state colorate mediante doppia-immunofluorescenza con un anticorpo contro Tiroglobulina contemporaneamente con un anticorpo contro TGN38 oppure con un anticorpo contro PLAP contemporaneamente con un anticorpo contro TGN38. Le cellule sono state analizzate col microscopio confocale.

Complessivamente questi risultati dimostrano che il gradiente protonico che s'instaura lungo la via secretoria è un fattore determinante per la secrezione della proteina VGF in cellule FRT e che esso modula la biogenesi dei granuli dal TGN e la efficienza di secrezione della proteina.

Nella proteina VGF non vi è un singolo dominio responsabile della sua aggregazione

Per individuare, nella catena polipeptidica di VGF, la presenza di un segnale discreto responsabile dell'aggregazione della proteina, comparabile a quello individuato nella cromogranina B, abbiamo utilizzato dei costrutti che codificano per proteine mutanti costituite da porzioni della proteina VGF, in particolare: VGF80-285, VGF286-450 e VGF450-611.

Questi tre frammenti continuano ad essere ricchi in residui acidi e in proline e ad avere il punto isoelettrico teorico nel range di quelli delle granine.

Abbiamo espresso i mutanti in cellule FRT ed abbiamo ottenuto linee cellulari che esprimevano stabilmente le proteine troncate. Per valutare quindi la loro capacità di aggregare abbiamo trattato i lisati cellulari con i due buffer, quello aggregante o quello non aggregante (Fig. 14).

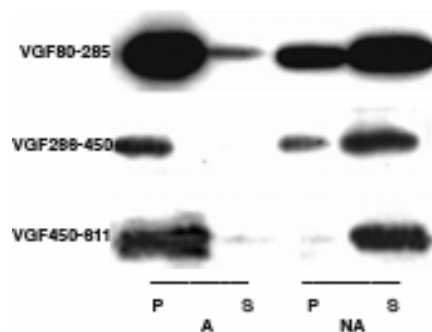


Fig. 14

Cellule FRT-VGF 80-285, FRT-VGF 286-450 e FRT-VGF 450-617 sono state coltivate in piastra da 100 mm e lisate per 20 min. In 0,5 ml di buffer aggregante (A): 10mM MES-NaOH, 10mM CaCl₂, pH6.4, 1% Triton X-100 o 0,5 ml di buffer non aggregante (NA): 10mM MES-NaOH, 60mM KCl, pH7.4, 1% Triton X-100. I campioni sono stati incubati per 15 min. in ghiaccio e centrifugati a 100000 g per 15 min. I sovranatanti (S) sono stati raccolti e i pellet (P) risospesi nei rispettivi buffer. Le proteine sono state precipitate con acido tricloroacetico e analizzate per SDS-PAGE e western blot con un anticorpo contro Myc-tag.

Il test di aggregazione ci ha permesso di determinare che le tre proteine troncate, mutanti di VGF, sono tutte capaci di formare aggregati. Questa osservazione induce a ritenere che VGF non contenga un singolo dominio proteico responsabile della capacità di formare aggregati.

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo analizzato il ruolo dell'aggregazione nel processo di secrezione della proteina VGF.

Il nostro punto di partenza è stata l'osservazione che la proteina VGF, espressa stabilmente in cellule epiteliali tiroidee FRT, è segregata in granuli secretori che si accumulano nella cellula e che vengono esocitati dal polo apicale delle cellule dopo stimolazione con PMA [32]. Ci siamo chiesti se l'aggregazione è parte del meccanismo molecolare mediante il quale la proteina VGF viene indirizzata nel compartimento della via secretoria regolata e se è essa stessa responsabile della formazione ex novo di granuli secretori.

VGF è una granina

Lo studio delle proprietà fisico-chimiche della proteina VGF ha suggerito una somiglianza tra VGF ed i membri della famiglia delle granine [48].

VGF, infatti, condivide molte proprietà con le granine, quali la ricchezza in amminoacidi acidi e in proline, il punto isoelettrico basso, la presenza di una sequenza amminoacidica consenso delle granine e siti di taglio per ormono-convertasi. A queste evidenti somiglianze possiamo aggiungere, a seguito di risultati sperimentali qui presentati, l'elevata termostabilità, la capacità di formare aggregati e la capacità di indurre la formazione di granuli in cellule che si ritiene non posseggano il macchinario

per la secrezione regolata delle proteine. Riteniamo di poter proporre, a conclusione di questo lavoro, che VGF debba essere inclusa nella classe delle granine.

VFG aggrega

La capacità di aggregare è una delle più interessanti proprietà delle granine ed è stata oggetto principale delle nostre osservazioni. Abbiamo utilizzato più strategie per dimostrare che VGF è capace di formare aggregati e per caratterizzare questi aggregati. Abbiamo innanzitutto risospeso i lisati cellulari in cui era contenuta la proteina VGF in un tampone ad elevata concentrazione di calcio ed a pH basso. L'utilizzo di questo tampone è stato proposto [12, 29] con l'intento di simulare in vitro le condizioni chimico-fisiche che si ritiene siano caratteristiche del TGN e per dimostrare che proteine appartenenti alla famiglia delle granine sono capaci di formare aggregati se risospese in questo tampone. L'implicazione di questa osservazione è che, in vivo, proteine destinate alla via di secrezione regolata, aggregano nel TGN e che l'aggregazione sia un momento critico nella formazione e successiva gemmazione dei granuli secretori. Abbiamo dimostrato che la proteina VGF espressa in cellule FRT forma aggregati quando viene risospesa in tampone ad alto calcio e basso pH e che la formazione di aggregati è specifica per VGF rispetto ad altre

proteine secretorie ed è anche specifica per la proteina VGF intracellulare rispetto a quella secreta nel terreno di coltura.

Proteine solubili, come la tireoglobulina, oppure con ancora GPI, come PLAP, non formano aggregati nelle stesse condizioni di elevato calcio e basso pH, indicando che non si tratta di un artefatto e che l'aggregazione è specifica per la proteina VGF. E' peraltro sorprendente che la tireoglobulina non formi aggregati poichè essa ha una capacità intrinseca di formare sia dimeri, sia oligomeri a peso molecolare più elevato. Inoltre, nella ghiandola tiroidea in vivo, la tireoglobulina si accumula nel lume dei follicoli dove tende a formare aggregati che possono comprendere l'intero contenuto di un singolo lume ed essere estremamente compatti e resistenti alla dissociazione [49]. E' anche interessante notare che nella ghiandola tiroidea si determinano condizioni di elevata concentrazione di calcio e che la più elevata concentrazione di calcio si ritrova appunto nel lume dove si accumula la tireoglobulina [50]. Evidentemente, al di là della elevata concentrazione di calcio, sono altre le proprietà fisico-chimiche (concentrazione proteica, pH, etc.) che favoriscono la aggregazione delle molecole di tireoglobulina.

Meccanismo molecolare di aggregazione delle granine

Per quanto concerne il meccanismo molecolare di aggregazione delle granine, è stato dimostrato che, nel caso della CgA, il

calcio svolge un ruolo critico poichè induce cambi di conformazione con riduzione dell'alfa-elicità ed esposizione di residui idrofobici, i quali sarebbero i veri responsabili del processo di aggregazione [30]. E' stato anche dimostrato che condizioni di basso pH favoriscono la formazioni di tetrameri di CgA mentre a pH neutro la proteina è in forma di monomeri o di dimeri [51]. Anche se le condizioni di alto calcio e basso pH sono critiche per l'aggregazione delle granine in genere, non per tutte l'aggregazione dipende, nello stesso modo, dalle stesse condizioni chimico-fisiche [43]. Il ruolo del calcio appare in ogni caso estremamente importante e l'associazione tra calcio e granine è così rilevante che i granuli secretori rappresentano un importante serbatoio di calcio intracellulare [52].

Noi non abbiamo acquisito informazioni sperimentali sul meccanismo molecolare dell'aggregazione della proteina VGF. Abbiamo tuttavia osservato che la proteina secreta dalle cellule nel terreno di coltura non manifesta la capacità di formare aggregati. Ciò potrebbe significare che la proteina VGF secreta extracellulare ha proprietà differenti, e quindi struttura molecolare differente da quella intracellulare, oppure che essa non abbia la capacità intrinseca di formare aggregati e che altri fattori, e quindi altre interazioni molecolari, sono rilevanti ai fini dell'aggregazione. Pur non potendola escludere, la prima ipotesi appare poco probabile. La proteina VGF presente nel terreno di coltura ha un peso molecolare indistinguibile, su

SDS-PAGE, da quella intracellulare e ciò esclude che vi siano modifiche rilevanti, quale potrebbe essere un taglio proteolitico. Certo, non si possono escludere modifiche che non alterano significativamente il peso molecolare, quale potrebbe essere la rimozione di uno o pochi amminoacidi. Questa ipotesi appare tuttavia poco verosimile anche alla luce del fatto che proteine VGF troncate, in particolare, VGF80-285, VGF286-450 e VGF450-611, sono ancora capaci di aggregare indicando così che questa capacità è distribuita in regioni differenti della proteina. Questo risultato è difficile da interpretare perchè, indicando che la proprietà di aggregare è diffusa su tutta la proteina, rende difficile spiegare perchè non sia mantenuta anche dalla proteina nativa secreta. D'altro canto, se si ipotizza che la proteina VGF per aggregare ha bisogno di interagire con altri componenti della cellula, ciò dovrebbe implicare che tutte le proteine troncate conservano la capacità di interagire con questi presunti componenti. Una ipotesi verosimile, che potrebbe fornire una interpretazione convincente di questi dati, è che la proteina VGF interagisca con componenti lipidiche delle membrane cellulari e che sia questa interazione a catalizzare la formazione di aggregati in cui, oltre a VGF, sono forse presenti altre proteine. Questa ipotesi si basa sull'evidenza che la proteina VGF interagisce con rafts lipidici, probabilmente con il ganglioside GM1 (Corteggio et al, unpublished), e che nella proteina VGF sono intersperse sequenze amminoacidiche a cui è stata attribuita la capacità di

promuovere l'interazioni con GM1. Non vi sono tuttavia evidenze sperimentali che indicano che tali interazioni favoriscono l'aggregazione.

VGF si trova in aggregati ad alto peso molecolare con altre proteine endogene

Per confermare la formazione di aggregati da parte della proteina VGF e per caratterizzare gli aggregati stessi abbiamo utilizzato tre differenti approcci: separazione elettroforetica in gel non riducenti di VGF dopo cross-linking con DSP, velocity gradient e gel filtration. Tutte e tre queste tecniche hanno dimostrato che una quota significativa di VGF intracellulare è presente in aggregati ad alto peso molecolare. L'utilizzo di condizioni sperimentali differenti nelle tre metodologie non le rende direttamente comparabili e pertanto non è possibile una stima accurata della dimensione molecolare degli aggregati. L'analisi mediante uso del cross-linker indica che molecole di VGF negli aggregati sono adiacenti e quindi interagiscono direttamente tra loro. D'altro canto la mancata conoscenza di eventuali altre componenti proteiche e/o lipidiche che co-aggregano con la proteina VGF rende impossibile la valutazione del numero di subunità di VGF presenti in un singolo aggregato.

Abbiamo cercato di identificare proteine endogene che si ritrovano negli aggregati dei lisati di cellule FRT-VGF in

presenza di alto calcio e basso pH. Era stato dimostrato che in queste condizioni le proteine della matrice di granuli secretori purificati mostrano una capacità di aggregare simile a quella delle granine [53].

La separazione su SDS-page e la colorazione con silver staining degli aggregati contenenti VGF ha rivelato la presenza di alcune proteine endogene non presenti nella frazione solubile. Abbiamo ipotizzato, sulla base del peso molecolare e delle proprietà fisico-chimiche descritte in letteratura, che una delle proteine fosse la FL2 [44] ed abbiamo confermato la sua natura utilizzando un anticorpo specifico in una analisi per western blot. Tuttavia, l'analisi al confocale con doppia immunofluorescenza ha dimostrato che, in vivo, VGF e FL2 hanno una distribuzione intracellulare assolutamente non sovrapponibile, suggerendo quindi che non vi sia co-aggregazione e che le due proteine non interagiscano per nulla pur avendo entrambe la capacità di precipitare ad alto calcio e basso pH. Questa osservazione è stata confermata all'analisi per gel filtration laddove le due proteine VGF e FL2 segregano in due frazioni affatto distinte (Corteggio et al, unpublished).

La proteina VGF è capace di indurre la formazione di granuli

Abbiamo espresso la proteina VGF in differenti linee di cellule in coltura: FRT, MDCK ed NIH3T3. In tutte abbiamo

osservato, mediante immunofluorescenza, la presenza di granuli contenenti VGF. Nelle cellule FRT abbiamo anche dimostrato che questi granuli si comportano come *bona fide* granuli secretori perchè hanno un denso core al microscopio elettronico, si accumulano nelle cellule, hanno una lunga vita media e sono esocitati a seguito di stimolazione [32]. Le cellule FRT sono derivate da tiroide di ratto [41], verosimilmente dalle cellule epiteliali che costituiscono il follicolo e che rappresentano la popolazione di cellule endocrine della tiroide. La capacità di queste cellule di formare granuli secretori, sebbene non sia dimostrata con certezza, non può essere esclusa. Le cellule follicolari tiroidee, in vivo, sintetizzano e secernono la tireoglobulina, un pro-ormone che viene trasportato verso il lume del follicolo in granuli descritti come 'apical vesicles'. Sebbene vi siano evidenze che indicano che questi granuli seguono una via di secrezione regolata, la possibilità che seguano invece la via costitutiva è tutt'altro che esclusa. Nelle cellule FRT, che in vitro non esprimono proprietà differenziate, la tireoglobulina riespressa a seguito di trasfezione, viene secreta con una modalità che è distinta da quella di VGF e che appare assolutamente assimilabile ad una via costitutiva. Nelle cellule FRT, pertanto, la presenza di VGF in una via di secrezione regolata, se da un lato sorprende per la natura indifferenziata della linea cellulare, dall'altro potrebbe essere giustificato dalla origine endocrina delle cellule stesse. Non vi sono pertanto solidi argomenti per sostenere che VGF

sia responsabile della induzione di una via di secrezione regolata nelle cellule FRT.

Nelle cellule MDCK ed NIH3T3, invece, si ritiene che una via di secrezione regolata sia normalmente assente e priva di significato funzionale. Si può pertanto ritenere che i granuli che si osservano a seguito della trasfezione della proteina VGF siano indotti dalla proteina stessa. Fino a che punto questi granuli condividano le caratteristiche dei granuli secretori è argomento che va al di là degli obiettivi di questo lavoro.

La capacità che le granine hanno di regolare la biogenesi dei granuli secretori è stata studiata in più modelli sperimentali. E' stato inizialmente dimostrato che la ridotta espressione di CgA in cellule PC12 inibisce la formazione di granuli secretori e che l'espressione di CgA in cellule 6T3, incapaci di formare granuli secretori, ripristina questa capacità [54]. Il ruolo della CgA nella biogenesi dei granuli secretori è stato anche dimostrato in topi KO per CgA [55] ed in topi transgenici esprimenti RNA antisenso contro CgA [56] suggerendo che CgA possa essere un 'master switch' nella biogenesi di granuli secretori. E' stato tuttavia anche dimostrato che altre granine, come la CgB e la SgII, e forse anche altre proteine di via regolata, sono capaci di indurre la formazione di granuli secretori [16, 43]. La proteina VGF rappresenterebbe dunque un ulteriore esempio di una granina la cui espressione è in grado di indurre la formazione di strutture con caratteristiche di granuli secretori. Questa

proprietà appare legata alla capacità di VGF di formare aggregati.

L'aggregazione di VGF è rilevante per la sua secrezione regolata

Allo scopo di comprendere quale sia il ruolo dell'aggregazione nel processo di secrezione di VGF abbiamo provato ad interferire con le proprietà fisico-chimiche dei compartimenti intracellulari. Dal momento che l'aggregazione richiede condizioni di alto calcio e basso pH e dal momento che è molto difficile abbassare i livelli di calcio intracellulare per tempi lunghi senza produrre alle cellule alterazioni gravi, abbiamo deciso di modificare il pH della via secretoria utilizzando la Bafilomicina A1 che interferisce con la pompa protonica V-ATPasi principale responsabile del mantenimento del pH [47]. Abbiamo effettuato due distinte osservazioni: la prima, di carattere morfologico, indica una sostanziale diminuzione del numero di granuli secretori, accompagnato dalla disorganizzazione del TGN; la seconda, di natura biochimica, indica una drammatica riduzione della secrezione della proteina VGF. Questa riduzione è specifica per VGF, che è secreta per via regolata, e non riguarda proteine secrete per via costitutiva, come Tg e PLAP. Quest'ultima osservazione è particolarmente importante poichè indica che non vi è una alterazione dell'apparato di Golgi tale da inibire completamente la sua

funzionalità. E' invece più verosimile che solo la regione più trans del Golgi, il TGN, sia disorganizzato strutturalmente pur conservando la capacità di smistare correttamente proteine di via costitutiva alla membrana plasmatica.

La proteina VGF che non è più secreta per via regolata non lo è nemmeno per via costitutiva. Riteniamo verosimile che essa possa andare incontro a degradazione intracellulare. I nostri risultati differiscono sotto questo aspetto da quelli ottenuto con la CgA[46] che mostrano come la proteina che non viene più secreta per via regolata è invece secreta per via costitutiva.

VGF forma aggregati anche in cellule PC12

Noi abbiamo trasfettato VGF in linee di cellule che non esprimono normalmente questa proteina. Si pone pertanto il problema del significato delle osservazioni eseguite e della loro utilizzazione ai fini della comprensione dei meccanismi fisiologici di secrezione di VGF. I risultati ottenuti in cellule FRT globalmente suggeriscono che VGF forma aggregati, che questi aggregati sono importanti per indirizzare correttamente la proteina nella via regolata e che l'informazione per formare aggregati e per l'indirizzo nella via regolata è presente in più domini della proteina stessa.

VGF è espressa in maniera endogena dalle cellule PC12 che la secernono per via regolata. E' stato recentemente proposto che, in cellule PC12 ed INS1, che esprimono VGF endogeno, questa

proteina viene indirizzata nella via di secrezione regolata grazie alla interazione con pro-ormono convertasi che riconoscono un sito di taglio costituito da tre arginine nelle posizioni 544-546 della proteina. La mutazione di questo sito blocca la secrezione regolata di VGF [57]. Nelle cellule FRT l'indirizzo nella via regolata non richiede nè la presenza nè l'utilizzo di quel sito di taglio. Infatti, mutanti troncati di VGF, che non contengono la regione 544-546, vengono ancora indirizzati nella via regolata. E' interessante notare che anche nelle cellule PC12 la proteina VGF è in grado di formare aggregati in presenza di alto calcio e basso pH. Questo risultato rappresenta un elemento di discordanza tra il nostro lavoro e quello di Garcia et al. [57]. Sarebbe pertanto interessante per il futuro verificare se nelle cellule PC12 l'interferenza col pH dei compartimenti della via secretoria modifica l'indirizzo di VGF in granuli secretori e se il mutante nelle posizioni 544-546 perde la capacità di formare aggregati.

Conclusione

In questo lavoro abbiamo dimostrato che la proteina VGF ha molte proprietà delle granine e che, come le granine manifesta la capacità di aggregare e di indurre la formazione di granuli in cellule incapaci di secrezione regolata come le cellule MDCK e NIH3T3. Nelle cellule FRT, la proteina VGF si accumula in compartimenti con caratteristiche di granuli secretori di via

regolata che appaiono gemmare a livello del TGN. E' possibile interferire con la formazione dei granuli e con la secrezione regolata alterando il pH di compartimenti della via secretoria.

Questi risultati evidenziano il ruolo critico dell'aggregazione nel processo di secrezione della proteina VGF.

Ci appare importante, nello sviluppo futuro di questo lavoro, individuare altre componenti, proteine e/o lipidi, con cui VGF interagisce per delucidare il meccanismo molecolare con cui l'aggregazione conduce alla formazione dei granuli secretori.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. B. Kelly, Pathways of protein secretion in eukaryotes, *Science* 230 (1985) 25-32.
- [2] T. L. Burgess, R. B. Kelly, Constitutive and regulated secretion of proteins, *Annu Rev Cell Biol* 3 (1987) 243-93.
- [3] E. Chanat, S. W. Pimplikar, J. C. Stinchcombe, W. B. Huttner, What the granins tell us about the formation of secretory granules in neuroendocrine cells, *Cell Biophys* 19 (1991) 85-91.
- [4] W. B. Huttner, M. Ohashi, R. H. Kehlenbach, F. A. Barr, R. Bauerfeind, O. Braunling, et al., Biogenesis of neurosecretory vesicles, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60 (1995) 315-27.
- [5] S. G. Miller, H. P. Moore, Regulated secretion, *Curr Opin Cell Biol* 2 (1990) 642-7.
- [6] S. A. Tooze, W. B. Huttner, Cell-free protein sorting to the regulated and constitutive secretory pathways, *Cell* 60 (1990) 837-47.
- [7] S. A. Tooze, Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells, *Biochim Biophys Acta* 1404 (1998) 231-44.
- [8] S. Urbe, S. A. Tooze, F. A. Barr, Formation of secretory vesicles in the biosynthetic pathway, *Biochim Biophys Acta* 1358 (1997) 6-22.
- [9] E. Chieriegatti, J. Meldolesi, Regulated exocytosis: new organelles for non-secretory purposes, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 181-7.
- [10] S. A. Tooze, G. J. Martens, W. B. Huttner, Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE, *Trends Cell Biol* 11 (2001) 116-22.
- [11] F. Wendler, L. Page, S. Urbe, S. A. Tooze, Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6, *Mol Biol Cell* 12 (2001) 1699-709.
- [12] E. Chanat, W. B. Huttner, Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network, *J Cell Biol* 115 (1991) 1505-19.
- [13] L. Carnell, H. P. Moore, Transport via the regulated secretory pathway in semi-intact PC12 cells: role of intra-cisternal calcium and pH in the transport and sorting of secretogranin II, *J Cell Biol* 127 (1994) 693-705.
- [14] B. Borgonovo, J. Ouwendijk, M. Solimena, Biogenesis of secretory granules, *Curr Opin Cell Biol* 18 (2006) 365-70.
- [15] O. Kakhlon, P. Sakya, B. Larijani, R. Watson, S. A. Tooze, GGA function is required for maturation of neuroendocrine secretory granules, *Embo J* 25 (2006) 1590-602.
- [16] N. Beuret, H. Stettler, A. Renold, J. Rutishauser, M. Spiess, Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells, *J Biol Chem* 279 (2004) 20242-9.

- [17] A. Kromer, M. M. Glombik, W. B. Huttner, H. H. Gerdes, Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis, *J Cell Biol* 140 (1998) 1331-46.
- [18] D. R. Cool, E. Normant, F. Shen, H. C. Chen, L. Pannell, Y. Zhang, et al., Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice, *Cell* 88 (1997) 73-83.
- [19] N. X. Cawley, Y. M. Rodriguez, A. Maldonado, Y. P. Loh, Trafficking of mutant carboxypeptidase E to secretory granules in a beta-cell line derived from Cpe(fat)/Cpe(fat) mice, *Endocrinology* 144 (2003) 292-8.
- [20] N. X. Cawley, J. Zhou, J. M. Hill, D. Abebe, S. Romboz, T. Yanik, et al., The carboxypeptidase E knockout mouse exhibits endocrinological and behavioral deficits, *Endocrinology* 145 (2004) 5807-19.
- [21] S. Hahm, T. M. Mizuno, T. J. Wu, J. P. Wisor, C. A. Priest, C. A. Kozak, et al., Targeted deletion of the Vgf gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance, *Neuron* 23 (1999) 537-48.
- [22] A. Levi, J. D. Eldridge, B. M. Paterson, Molecular cloning of a gene sequence regulated by nerve growth factor, *Science* 229 (1985) 393-5.
- [23] A. Levi, G. L. Ferri, E. Watson, R. Possenti, S. R. Salton, Processing, distribution, and function of VGF, a neuronal and endocrine peptide precursor, *Cell Mol Neurobiol* 24 (2004) 517-33.
- [24] S. R. Salton, G. L. Ferri, S. Hahm, S. E. Snyder, A. J. Wilson, R. Possenti, et al., VGF: a novel role for this neuronal and neuroendocrine polypeptide in the regulation of energy balance, *Front Neuroendocrinol* 21 (2000) 199-219.
- [25] E. Trani, T. Ciotti, A. M. Rinaldi, N. Canu, G. L. Ferri, A. Levi, et al., Tissue-specific processing of the neuroendocrine protein VGF, *J Neurochem* 65 (1995) 2441-9.
- [26] D. L. Benson, S. R. Salton, Expression and polarization of VGF in developing hippocampal neurons, *Brain Res Dev Brain Res* 96 (1996) 219-28.
- [27] G. L. Ferri, R. M. Gaudio, M. Cossu, A. M. Rinaldi, J. M. Polak, P. Berger, et al., The "VGF" protein in rat adenohypophysis: sex differences and changes during the estrous cycle and after gonadectomy, *Endocrinology* 136 (1995) 2244-51.
- [28] R. Possenti, J. D. Eldridge, B. M. Paterson, A. Grasso, A. Levi, A protein induced by NGF in PC12 cells is stored in secretory vesicles and released through the regulated pathway, *Embo J* 8 (1989) 2217-23.
- [29] H. H. Gerdes, P. Rosa, E. Phillips, P. A. Baeuerle, R. Frank, P. Argos, et al., The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation, *J Biol Chem* 264 (1989) 12009-15.
- [30] S. H. Yoo, J. P. Albanesi, Ca²⁺(+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin A, *J Biol Chem* 265 (1990) 14414-21.

- [31] S. H. Yoo, pH- and Ca(2+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin B. Comparison with chromogranin A and implication in secretory vesicle biogenesis, *J Biol Chem* 270 (1995) 12578-83.
- [32] F. Gentile, G. Cali, C. Zurzolo, A. Corteggio, P. Rosa, F. Calegari, et al., The neuroendocrine protein VGF is sorted into dense-core granules and is secreted apically by polarized rat thyroid epithelial cells, *Exp Cell Res* 295 (2004) 269-80.
- [33] C. Lipardi, L. Nitsch, C. Zurzolo, Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting, *Mol Biol Cell* 11 (2000) 531-42.
- [34] Z. Muresan, P. Arvan, Thyroglobulin transport along the secretory pathway. Investigation of the role of molecular chaperone, GRP94, in protein export from the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* 272 (1997) 26095-102.
- [35] R. Possenti, A. M. Rinaldi, G. L. Ferri, P. Borboni, E. Trani, A. Levi, Expression, processing, and secretion of the neuroendocrine VGF peptides by INS-1 cells, *Endocrinology* 140 (1999) 3727-35.
- [36] A. N. van den Pol, C. Decavel, A. Levi, B. Paterson, Hypothalamic expression of a novel gene product, VGF: immunocytochemical analysis, *J Neurosci* 9 (1989) 4122-37.
- [37] A. Bartolomucci, G. La Corte, R. Possenti, V. Locatelli, A. E. Rigamonti, A. Torsello, et al., TLQP-21, a VGF-derived peptide, increases energy expenditure and prevents the early phase of diet-induced obesity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 14584-9.
- [38] H. Ozawa, K. Takata, The granin family--its role in sorting and secretory granule formation, *Cell Struct Funct* 20 (1995) 415-20.
- [39] F. T. Mu, J. M. Callaghan, O. Steele-Mortimer, H. Stenmark, R. G. Parton, P. L. Campbell, et al., EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif, *J Biol Chem* 270 (1995) 13503-11.
- [40] E. Cocucci, G. Racchetti, P. Podini, M. Rupnik, J. Meldolesi, Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a nonacidic route, *Mol Biol Cell* 15 (2004) 5356-68.
- [41] F. S. Ambesi-Impiombato, H. G. Coon, Thyroid cells in culture, *Int Rev Cytol Suppl* (1979) 163-72.
- [42] J. W. Chen, T. L. Murphy, M. C. Willingham, I. Pastan, J. T. August, Identification of two lysosomal membrane glycoproteins, *J Cell Biol* 101 (1985) 85-95.
- [43] Y. H. Huh, S. H. Jeon, S. H. Yoo, Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A, *J Biol Chem* 278 (2003) 40581-9.

- [44] C. Neumann-Giesen, B. Falkenbach, P. Beicht, S. Claasen, G. Luers, C. A. Stuermer, et al., Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression, *Biochem J* 378 (2004) 509-18.
- [45] J. P. Luzio, B. Brake, G. Banting, K. E. Howell, P. Braghetta, K. K. Stanley, Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38), *Biochem J* 270 (1990) 97-102.
- [46] L. Taupenot, K. L. Harper, D. T. O'Connor, Role of H⁺-ATPase-mediated acidification in sorting and release of the regulated secretory protein chromogranin A: evidence for a vesiculogenic function, *J Biol Chem* 280 (2005) 3885-97.
- [47] T. Umata, Y. Moriyama, M. Futai, E. Mekada, The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁽⁺⁾-ATPase, *J Biol Chem* 265 (1990) 21940-5.
- [48] K. B. Helle, The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects, *Biol Rev Camb Philos Soc* 79 (2004) 769-94.
- [49] U. Berndorfer, H. Wilms, V. Herzog, Multimerization of thyroglobulin (TG) during extracellular storage: isolation of highly cross-linked TG from human thyroids, *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996) 1918-26.
- [50] A. Haeberli, F. K. Millar, S. H. Wollman, Accumulation and localization of radiocalcium in the rat thyroid gland, *Endocrinology* 102 (1978) 1511-9.
- [51] S. H. Yoo, M. S. Lewis, Effects of pH and Ca²⁺ on monomer-dimer and monomer-tetramer equilibria of chromogranin A, *J Biol Chem* 267 (1992) 11236-41.
- [52] J. G. Duman, L. Chen, A. E. Palmer, B. Hille, Contributions of intracellular compartments to calcium dynamics: implicating an acidic store, *Traffic* 7 (2006) 859-72.
- [53] S. H. Yoo, pH- and Ca⁽²⁺⁾-dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis, *J Biol Chem* 271 (1996) 1558-65.
- [54] T. Kim, J. H. Tao-Cheng, L. E. Eiden, Y. P. Loh, Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis, *Cell* 106 (2001) 499-509.
- [55] N. R. Mahapatra, D. T. O'Connor, S. M. Vaingankar, A. P. Hikim, M. Mahata, S. Ray, et al., Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog, *J Clin Invest* 115 (2005) 1942-52.
- [56] T. Kim, C. F. Zhang, Z. Sun, H. Wu, Y. P. Loh, Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis, *J Neurosci* 25 (2005) 6958-61.
- [57] A. L. Garcia, S. K. Han, W. G. Janssen, Z. Z. Khaing, T. Ito, M. J. Glucksman, et al., A prohormone convertase cleavage site within a predicted alpha-helix mediates sorting of the neuronal and endocrine polypeptide VGF into the regulated secretory pathway, *J Biol Chem* 280 (2005) 41595-608.

